#### 면역질환 치료용 약제학적 조성물

{PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATMENT OF IMMUNOLOGICAL DISORDERS}

## 기술분야

ţ,

5

10

20

25

본 발명은 MHC(Major Histocompatibility Complex) Class II 분자와이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질, 공조자극 분자와이의 수용체의결합을 차단할 수 있는 물질, 부착 분자와이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질 및 사이토카인과이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질로이루어진 그룹으로부터 2종 이상 선택된 물질을 활성 성분으로 포함하여 T 림프구의 활성화를 억제하는 면역질환 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

## <u>종래기술</u>

자가면역이다.

15 면역 반응이란 각종 이물질, 세균 또는 바이러스 등의 자신이 아닌 것으로부터 자신을 보호하는 과정으로, 자신은 공격하지 않도록 정교하게 설계되어 있다. 그러나 이러한 면역 반응이 오히려 자신을 공격하여 자신에게 해를 미치는 경우가 있는데, 대표적인 예가 장기 또는 조직 이식 후와

장기 또는 조직 이식에 의한 질병 치료에 있어서, 가장 큰 문제점은 수령자가 공여자로부터 조직 또는 장기를 이식받은 후에 심각한 장기이식 합병증을 보인다는 것이다. 장기이식 합병증은 이식편의 공여자와 수령자간의 유전적 배경이 상이함에 따라 서로를 이물질로 인식하여 배제하려는 면역 반응을 의미한다. 이러한 장기이식 합병증은 T 림프구에 의한 세포성 면역과 항체에 의한 체액성 면역이 복잡하게 제휴된 형태로 일어나지만, 주로 T 림프구에 의한 세포성 면역이다.

장기이식 합병증을 치료하기 위한 하나의 방법으로 T 림프구의 활성을 억제하는 화합물들이 이용되고 있다. 예를 들면, 미조리빈(mizoribine; MZ), 사이클로스포린(cyclosporin; CsA), 타크롤리무스(tacrolimus; FK-506), 아자티오프린(azathioprine; AZ), 레플루노마이드(leflunomide; LEF), 프레도니졸론(predonisolon) 또는 메틸프레도니졸론(methylpredonisolon) 등의 부신피질 스테로이드, 데옥시퍼구알린(deoxypergualin; DGS) 및 시롤리무스(sirolimus) 등이 있다.

국제특허공개 WO 1999/65908호는 피롤로[2,3-디] 피리미딘 화합물을 면역 억제제로 이용하여 자가면역 질환을 치료하는 방법을 개시하고 있으며, 국제특허공개 WO 2000/21979호는 사이클릭 테트라펩티드 화합물을 이용하여 장기 이식 거부 반응 또는 자가면역 질환을 치료하는 방법을 개시하고 있다. 한편, 면역 세포가 자신과 외부 물질을 구별하지 못하고 자신을 공격하는 경우가 있는데 이러한 현상을 "자가면역(autoimmune)" 이라고 한다. 이러한 자가 면역은 인체의 모든 부위에 걸쳐서 질병을 유발시킬 수 있는데, 예를 들면, 류마티스 관절염(Rheumatoid Arthritis), 다발성 경화증((Multiple Sclerosis), 중증 근무력증(Myasthenia gravis), 그레브스병(Grave's Disease). 하시모토씨 갑상선염(Hashimoto's Thyroiditis). 애디슨병(Addison's Disease), 백반증(Vitilligo), 경피증 (Scleroderma), 신드롬(Goodpasture syndrome), 베제트병(Becet's 굿패스쳐 Disease). 크론병(Crohn's Disease), 강직성 척추염(Ankylosing Spondylitis), 포도막염(Uveitis), 혈소판 감소성 자반증(Thrombocytopenic purpura), 심상성 천포창(Pemphigus vulgaris), 소아 당뇨병(Diabetes), 자가면역성 용혈성 빈혈(Autoimmune Anemia), 크라일로글로불린증(Cryoglobulinemia), 부신백질이영양증(ALD), 전신성 홍반성 낭창(Systemic Lupus Erythematosus, SLE) 등이 있다.

10

15

20

25

국제특허공개 WO 1996/40246호는 다발성 경화증과 같은 T 림프구

매개된 자기면역 질환을 치료 및 예방하는 방법에 관한 것으로 보다 자세하게는 피검자에게 접촉 의존성 헬퍼 이펙터 기능을 매개하는 T 림프구의 표면상의 수용체의 길항제를 치료 또는 예방 유효량으로 투여하는 방법에 관한 것이다. 상기 길항제로는 T 림프구 수용체 gp39에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편이 이용된다.

*i* -

국제특허공개 WO 2002/22212호는 하나 이상의 면역조절항체 및 하나이상의 B 림프구 고갈 항체, 예를 들어 CD20, CD19, CD22, CD23 또는 CD27을 표적화하는 항체의 조합을 이용하여 자가면역 질환, 바람직하게는 B 림프구매개 자가면역 질환을 치료하는 방법을 개시하고 있다.

고러나, 상술한 화합물을 이용하여 면역질환을 치료하는 경우에는 그부작용이 심각하여 사용이 제한적이며, 국제특허공개 ₩0 1996/40246 호와 같이 항체를 단독으로 투여하는 경우에는 충분한 치료 효과를 달성하기 어렵다. 또한, 자가면역 질환 또는 장기 이식 합병증은 T 림프구의 활성화에 의해시작되므로 국제특허공개 ₩0 2002/22212호와 같이 B 림프구의 기능을 차단하는 것은 효율적인 면역 반응의 억제로 이어지지 못한다.

## 발명의 요약

5

보다 효과적인 면역 억제제를 개발하기 위하여 본 발명자들은 T 리프구의 활성화에 관여하는 여러 군의 단백질 중 적어도 둘 이상의 군에서 선택된 단백질을 동시에 차단하였을 때 T 림프구의 활성을 공지된 방법들과 비교했을 때 효과적으로 억제할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

본 발명은 한 관점으로 MHC Class II 분자와 이의 수용체의 결합을 25 차단할 수 있는 물질, 공조자극 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질, 부착 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질 및 사이토카인과 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질로 이루어진 그룹으로부터 2종 이상 선택된 물질을 활성 성분으로 포함하여 T 림프구의 활성화를 억제하는 면역질환 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

## 5 도면의 간단한 설명

15

도 1은 본 발명에 따른 연쇄 융합된 단량체 단백질 CD2-CD2/Fc를 발현하는 재조합 발현 플라스미드 pCD22Ig의 유전자 지도를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 연쇄 융합된 단량체 단백질 CTLA4-CTLA4/Fc를 10 발현하는 재조합 발현 플라스미드 pCT44Ig의 유전자 지도를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명에 따른 연쇄 융합된 단량체 단백질 LAG3-LAG3/Fc를 발현하는 재조합 발현 플라스미드 pLAG33Ig의 유전자 지도를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명에 따른 연쇄 융합된 단량체 단백질 TNFR2-TNFR1/Fc를 발현하는 재조합 발현 플라스미드 pTR21Ig-Top'의 유전자를 지도를 나타낸 것이다.

도 5a는 본 발명에 따른 단순 융합된 이량체 단백질([CD2/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4/Fc]<sub>2</sub>, [LAG3/Fc]<sub>2</sub>) 및 연쇄 융합된 이량체 단백질([CD2-CD2/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4-CTLA4/Fc]<sub>2</sub>, [LAG3-LAG3/Fc]<sub>2</sub>)의 SDS-PAGE 결과를 나타낸 것이다.

도 5b는 본 발명에 따른 단순 융합된 이량체 단백질(1:[TNFR1/Fc]<sub>2</sub>, 20 2:[TNFR2/Fc]<sub>2</sub>) 및 연쇄 융합된 이량체 단백질(3:[TNFR2-TNFR1/Fc]<sub>2</sub>, 4:[TNFR2-TNFR2/Fc]<sub>2</sub>)의 SDS-PAGE 결과를 나타낸 것이다.

도 6a는 본 발명에 따른 단순 융합된 이량체 단백질([TNFR2/Fc]<sub>2</sub>, [CD2/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4/Fc]<sub>2</sub>, [LAG3/Fc]<sub>2</sub>)이 T-림프구의 증식을 억제함을 나타낸 그래프이다.

25 도 6b는 본 발명에 따른 단순 융합된 이량체 단백질의 혼합물([CTLA4/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + TNFR2/Fc]<sub>2</sub>, ([CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + [CD2/Fc]<sub>2</sub>, ([CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + [LAG3/Fc]<sub>2</sub>)이 T-림프구의 증식을 억제함을 나타낸 그래프이다.

도 6c은 본 발명에 따른 연쇄 융합된 이량체 단백질([TNFR2-TNFR2/Fc]<sub>2</sub>, [CD2-CD2/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4-CTLA4/Fc]<sub>2</sub>, [LAG3-LAG3/Fc]<sub>2</sub>)이 T 림프구의 증식을 억제함을 나타낸 그래프이다.

도 6d는 본 발명에 따른 연쇄 융합된 이량체 단백질의 혼합물([CTLA4-CTLA4/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4-CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + [TNFR2-TNFR2/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4-CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + [CD2-CD2/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4-CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + [LAG3-LAG3/Fc]<sub>2</sub>)이 T 림프구의 증식을 억제함을 나타낸 그래프이다.

5

15

20

도 7a는 본 발명에 따른 단순 융합된 이량체 단백질([TNFR2/Fc]<sub>2</sub>, 10 [CD2/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4/Fc]<sub>2</sub>, [LAG3/Fc]<sub>2</sub>)이 관절염을 완화시키는 정도를 나타낸 그래프이다.

도 7b는 본 발명에 따른 단순 융합된 이량체 단백질의 혼합물([CTLA4/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + TNFR2/Fc]<sub>2</sub>, ([CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + [CD2/Fc]<sub>2</sub>, ([CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + [LAG3/Fc]<sub>2</sub>)이 관절염을 완화시키는 정도를 나타낸 그래프이다.

도 7c는 본 발명에 따른 연쇄 융합된 이량체 단백질([TNFR2-TNFR2/Fc]<sub>2</sub>, [CD2-CD2/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4-CTLA4/Fc]<sub>2</sub>, [LAG3-LAG3/Fc]<sub>2</sub>)이 관절염을 완화시키는 정도를 나타낸 그래프이다.

도 7d는 본 발명에 따른 연쇄 융합된 이량체 단백질의 혼합물([CTLA4-CTLA4/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4-CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + [TNFR2-TNFR2/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4-CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + [CD2-CD2/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4-CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + [LAG3-LAG3/Fc]<sub>2</sub>)이 관절염을 완화시키는 정도를 나타낸 그래프이다.

도 8a는 본 발명에 따른 단순 융합된 이량체 단백질([CD2/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4/Fc]<sub>2</sub>, [LAG3/Fc]<sub>2</sub>)이 이식편대 숙주질환에 대한 생존율을 증가시키는 정도를 나타낸 그래프이다.

25 도 8b는 본 발명에 따른 단순 융합된 이량체 단백질의 혼합물([CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + [LAG3/Fc]<sub>2</sub>, [CD2/Fc]<sub>2</sub> + [CTLA4/Fc]<sub>2</sub>)이 이식편대 숙주질환에 대한 생존율을 증가시키는 정도를 나타낸 그래프이다.

도 8c는 본 발명에 따른 단순 융합된 이량체 단백질 [CTLA4/Fc]<sub>2</sub> 또는 연쇄 융합된 이량체 단백질 [CTLA4-CTLA4/Fc]<sub>2</sub>이 이식편대 숙주질환에 대한 생존율을 증가시키는 정도를 나타낸 그래프이다.

도 8d는 본 발명에 따른 단순 융합된 이량체 단백질 [TNFR2/Fc]<sub>2</sub> 또는 연쇄 융합된 이량체 단백질 [TNFR2-TNFR2/Fc]<sub>2</sub>이 이식편대 숙주질환에 대한 생존율을 증가시키는 정도를 나타낸 그래프이다.

도 8e는 본 발명에 따른 단순 융합된 이량체 단백질 [TNFR2/Fc]<sub>2</sub> 또는 연쇄 융합된 이량체 단백질([TNFR2-TNFR1/Fc]<sub>2</sub> 또는 [TNFR2-TNFR2/Fc]<sub>2</sub>)이 이식편대 숙주질환에 대한 생존율을 증가시키는 정도를 나타낸 그래프이다.

도 8f은 본 발명에 따른 연쇄 융합된 이량체 단백질([CD2-CD2/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4-CTLA4/Fc]<sub>2</sub>, [LAG3-LAG3/Fc]<sub>2</sub>) 또는 이들의 혼합물([CD2CD2/Fc]<sub>2</sub> + [CTLA4-CTLA4/Fc]<sub>2</sub>, [LAG3-LAG3/Fc]<sub>2</sub> + [CTLA4-CTLA4/Fc]<sub>2</sub>)이 이식편대 숙주질환에 대한 생존율을 증가시키는 정도를 나타낸 그래프이다.

# 발명의 상세한 설명

5

10

15

20

25

본 발명은 MHC Class II 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질, 공조자극 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질, 부착 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질 및 사이토카인과 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질로 이루어진 그룹으로부터 2종 이상 선택된 물질을 활성 성분으로 포함하여 T 림프구의 활성화를 억제하는 면역질환 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

당업계에 알려진 바와 같이 T 림프구는 항원 제시 세포(Antigenic Presenting Cell) 표면상의 "MHC(Major Histocompatibility Complex) Class

II 분자"와 결합된 형태의 항원만을 인식하게 되며, 이어서 활성화되어 상기 항원에 대항할 수 있는 면역 반응을 일으킨다. 이 때, 상기 MHC Class II 분자 이외에 T 림프구에 활성화 신호를 보내는 분자를 "공조자극분자(Costimulatory Molecules)"라고 하며, 신호를 보내는 기능과 함께 항원 제시 세포와 T 림프구의 접촉을 견고하게 하는 분자를 "부착 분자(Adhesive Molecules)"라고 한다. 한편, 다양한 "사이토카인 (Cytokine)"이 T 림프구의 활성화를 포함한 면역 반응에 관여하고 있다.

상기 "MHC Class II 분자"는 T 림프구의 활성화를 개시하는 분자로서, 이의 수용체에는 CD4와 LAG3가 있다. MHC Class II 분자는 항원과 결합된다음 T 림프구의 표면상에 위치한 MHC Class II 분자의 수용체(CD4)에 의해인식되어 T 림프구를 활성화시킨다. 따라서, 이러한 MHC Class II 분자의기능은 MHC Class II 분자와 이의 수용체의 결합을 차단함으로써 억제할 수있다. 그러한 작용을 할 수 있는 물질에는 이에 제한되는 것은 아니지만 MHC Class II 분자의 항체 및 유리 형태의 MHC Class II 분자의 수용체가 포함된다.여기서, 상기 유리 형태의 MHC Class II 수용체는 MHC Class II 분자와특이적으로 결합할 수 있는 모든 수용체를 포함하며, MHC Class II 수용체 또는 이의 세포외역 가용성 부위가 면역글로불린 전체 또는 이의 Fc 단편과결합된 Ig 융합 단백질 형태인 것이 바람직하다. 더 나아가, 상기 Ig 융합단백질은 추가로 당쇄화된(glycoslyatded) Ig 융합 단백질일 수도 있다.

상기 "공조자극 분자"에는 B7(B7.1 및 B7.2), CD154, CD70, 0X40L, ICOS-L, 4-1BBL, HVEM, FASL, PDL(PDL-1 및 PDL-2)이 있으며, 이들의 수용체는 각각 CD28과 CTLA-4, CD40, CD27, 0X40, ICOS, 4-1BB(CD137), LIGHT, FAS(CD95), PD-1이다. 공조자극 분자는 항원 제시 세포의 표면상에 발현되어 있으며, T 림프구의 표면상에 발현되어 있는 상기 공조자극 분자의 수용체와 결합하여 T 림프구를 활성화시킨다. 따라서, 공조자극 분자에 의한 T 림프구 활성화는 공조자극 분자와 이의 수용체의 결합을 차단함으로써 억제할 수 있다.

그러한 작용을 할 수 있는 물질에는 이에 제한되는 것은 아니지만 공조자극 분자의 항체 또는 유리 형태의 공조자극 분자의 수용체가 포함된다. 이 때, 상기 유리 형태의 공조자극 분자의 수용체는 공조자극 분자와 특이적으로 결합할 수 있는 모든 수용체를 포함하며, 공조자극 분자의 수용체 또는 이의 세포외역 가용성 부위가 면역글로불린 또는 이의 Fc 단편과 결합된 Ig 융합 단백질 형태인 것이 바람직하다. 더 나아가, 상기 Ig 융합 단백질은 추가로 당쇄화된 Ig 융합 단백질일 수도 있다.

상기 "부착 분자"에는 LFA-3, ICAM-1, VCAM-1이 있으며, 이들의 수용체는 각각 CD2, LFA-1, VLA-4이다. 부착 분자는 항원 제시 세포의 표면상에 발현되어 있으며, T 림프구의 표면상에 발현되어 있는 상기 부착 분자의 수용체와 결합하여 T 림프구를 활성화시킨다. 따라서, 부착 분자에 의한 T 림프구의 활성화는 부착 분자와 이의 수용체의 결합을 차단함으로써 억제할 수 있으며, 그러한 작용을 할 수 있는 물질에는 이에 제한되는 것은 아니지만 부착 분자의 항체 또는 유리 형태의 부착 분자의 수용체가 포함된다. 이 때, 상기 유리 형태의 부착 분자의 수용체는 부착 분자와 특이적으로 결합할 수 있는 모든 수용체를 포함하며, 부착 분자의 수용체 또는 이의 세포외역 가용성 부위가 면역글로불린 또는 이의 Fc 단편과 결합된 Ig 융합 단백질 형태인 것이 바람직하다. 더 나아가, 상기 Ig 융합 단백질은 추가로 당쇄화된 Ig 융합 단백질일 수도 있다.

상기 "사이토카인"에는 이들로 한정되는 것은 아니지만 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, TNF, TGF, IFN, GM-CSF, G-CSF, EPO, TPO, M-CSF 등이 있으며, 이들의 수용체는 각각 IL-1R, IL-2R, IL-3R, IL-4R, IL-5R, IL-6R, IL-7R, TNFR, TGFR, IFNR(예, IFN-γR α-쇄, IFN-γR β-쇄), 인터페론-α R, -β R 및 -γ R, GM-CSFR, G-CSFR, EPOR, cMpl, gp130이다. 사이토카인은 B 림프구 또는 T 림프구에 위치한 사이토카인의 수용체와 결합하여 면역 반응을 일으킨다. 따라서 사이토카인에 의한 면역 반응은

사이토카인과 이의 수용체의 결합을 차단함으로써 억제할 수 있다. 그러한 작용을 할 수 있는 물질에는 이에 제한되는 것은 아니지만 사이토카인에 대한 항체 또는 유리 형태의 사이토카인의 수용체가 포함된다. 이 때, 상기 유리형태의 사이토카인의 수용체는 사이토카인과 특이적으로 결합할 수 있는 모든수용체를 포함하며, 사이토카인의 수용체 또는 이의 세포외역 가용성 부위가면역글로불린 또는 이의 Fc 단편과 결합된 Ig 융합 단백질 형태인 것이바람직하다. 더 나아가, 상기 Ig 융합 단백질은 추가로 당쇄화된 Ig 융합단백질일 수도 있다.

# 10 I. 항체

15

20

25

본 발명에서 MHC Class II 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질로는 MHC Class II 분자의 항체가, 공조자국 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질로는 공조자국 분자의 항체가, 부착 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질로는 부착 분자의 항체가, 사이토카인과이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질로는 사이토카인의 항체가 각각 포함될 수 있다.

상기 항체는 폴리클로날(polyclonal) 또는 모노클로날(monoclonal) 일수 있으며, 이들은 모두 상업적으로 입수하거나 당업계에 공지된 방법에 따라제조할 수 있다. 폴리클로날 항체는 일반적으로 포유동물을 적절한 양의항원으로 1 회 이상의 회수로 면역화시키고 역가가 일정 수치에 이르렀을 때, 상기 포유동물의 항혈청으로부터 회수하여, 원하는 경우 공지된 공정을이용하여 정제하고, 사용시까지 냉동 완충된 용액에 저장할 수 있다. 한편, 모노클로날 항체는 포유동물에 항원을 주입하여 생긴 B 림프구를 분리해서마이엘로마 세포와 융합하여 하이브리도마 세포를 만들고 이를 배양하여

항체를 제조할 수 있다. 이러한 공정의 상세한 사항들은 당업계에 잘 알려져 있다.

#### II. Ig 융합 단백질

5

10

15

20

25

본 발명에서 MHC Class II 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질로는 MHC Class II 분자의 수용체의 Ig 융합 단백질이, 공조자극 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질로는 공조자극 분자의 수용체의 Ig 융합 단백질이, 부착 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질로는 부착 분자의 수용체의 Ig 융합 단백질이, 사이토카인과 이의수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질로는 사이토카인 수용체의 Ig 융합 단백질이 포함될 수 있다. 이하에서, MHC 수용체, 공조자극 분자의 수용체, 부착 분자의 수용체 및 사이토카인의 수용체는 모두 "수용체"라 통칭한다.

본 발명에서 "Ig 융합 단백질"은 수용체 단백질 또는 이의 세포외역 가용성 부위와 면역글로불린 또는 이의 Fc 단편이 연결된 형태를 포함하는 융합 단백질을 의미한다. 구체적으로 상기 Ig 융합 단백질에는 단순 융합된 단량체, 단순 융합된 이량체, 연쇄 융합된 단량체, 연쇄 융합된 이량체 및이들의 당쇄화된 단백질이 포함된다.

본 발명에서 "세포외역 가용성 부위(soluble extracellular domain)"는 인지질로 구성된 세포막을 관통하는 단백질(integral protein)에서 소수성 아미노산으로 구성되어 있어 세포막을 통과하는 부분(transmembrane domain)을 기준으로 세포외부로 노출되어 있는 부분을 가리킨다. 이 부위는 대부분 친수성 아미노산이 단백질 표면으로 향하는 구조(folding)를 하고 있어서 수용액상에서 가용성(soluble)을 나타낸다. 대부분의 세포표면 수용체 단백질에서 리간드와 결합하는 기능을

담당하는 것은 세포외역 부위이며 세포내역 부위(intracellular domain)는 세포내 신호전달 기능을 담당하고 있다.

Ū

본 발명에서 "면역글로불린"은 다양한 종류의 항원을 특이적으로 인식하도록 B 림프구에 의해 생성되고 B 림프구의 항원 수용체 역할을 하는 단백질 분자를 가리킨다. 이 분자는 Y 모양으로 두 개의 동일한 경쇄와 두개의 동일한 중쇄로 구성된다. 경쇄와 중쇄 모두는 가변 및 고정 영역을 포함한다. 4 개의 쇄는 힌지 영역이라고 하는 중쇄의 플렉서블 영역(flexible region)에 위치한 디설파이드 결합에 의해 함께 고정되어 있다. 중쇄와 경쇄모두의 가변 영역은 결합하여 두 개의 동일한 항원-결합 부위를 형성한다. 중쇄 고정 영역에 의해 면역글로불린 A(IgA), D(IgD), E(IgE), G(IgG) 및 M(IgM)인 다섯개 부류로 나누어진다. 보체 활성화, 식세포-Fc 수용체에의 결합, 항원-의존 세포독성과 같은 면역글로불린 분자의 기능은 중쇄의 Fc 영역에 존재하는 구조적 결정소에 의해 매개된다. 이러한 중쇄의 Fc 영역은 본 발명에 따른 Ig 융합 단백질의 구성 요소로서 사용되며 상기모든 부류의 면역글로불린으로부터 유래될 수 있다.

10

15

20

25

본 발명에서 "면역글로불린 Fc 단편"은 면역글로불린 분자를 기능적으로 구분되는 단편들로 나누어지는데 이 가운데 항원 결합력은 없으나쉽게 결정체를 형성하는 단편으로서 힌지 부위(hinge region), CH2 와 CH3 도메인이 결합하여 이루어지고 항체에서 효과물질 및 세포들과의 결합에 관여하는 부분을 가리킨다.

본 발명에서 "연쇄 융합된"이란 수용체 단백질의 세포외역 가용성부위의 C-말단에 또 다른 수용체 단백질의 세포외역 가용성 부위의 N-말단이 펩타이드 결합되어 수용체 단백질의 세포외역 가용성 부위 두 개가 하나의 긴폴리펩타이드를 형성하고 있는 형태를 의미한다.

본 발명에서 "단순 융합된 단량체 단백질"은 면역글로불린 Fc 단편의 힌지 부위에 수용체 단백질의 세포외역 가용성 부위가 결합하여 하나의 폴리펩타이드로 형성된 단량체 구조의 Ig 융합 단백질을 가리킨다. 단순융합된 단량체 단백질은 편의상 "수용체 단백질 명칭/Fc"로 표기할 수있다. 예를 들면 LAG3 의 세포외역 가용성 부위와 면역글로불린 Fc 단편이결합된 단순 융합된 단량체 단백질은 LAG3/Fc 로 표기된다. 또한,면역글로불린 Fc 단편의 유래를 표기할 수 있다. 예를 들면,면역글로불린 Fc 단편이 IgG1으로부터 유래된 경우에는 LAG3/IgG1Fc로 표기된다.

본 발명에서 "단순 융합된 이량체 단백질"은 단순 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 결합된 이량체 구조의 Ig 융합 단백질을 가리킨다. 단순 융합된 이량체 단백질은 편의상 "[수용체 단백질 명칭/Fc]2"로 표기할 수 있다. 예를 들면 LAG3 의 세포외역 가용성부위와 면역글로불린 Fc 단편이 결합된 단순 융합된 단량체 단백질 두 개가힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 결합된 이량체 구조의 융합 단백질은 [LAG3/Fc]2로 표기된다. 마찬가지로, 면역글로불린 Fc 단편의 유래를 표기할수 있다. 예를 들면, 면역글로불린 Fc 단편이 IgG1 으로부터 유래된 경우에는 [LAG3/IgG1Fc]2로 표기된다.

본 발명에서 "연쇄 융합된 단량체 단백질"은 단순 융합된 단량체 단백질에서 힌지 부위에 결합된 수용체 단백질의 세포외역 가용성 부위의 N-말단에 또 다른 수용체 단백질의 세포외역 가용성 부위의 C-말단이 직렬의 연쇄체 형태로 결합하여 하나의 폴리펩타이드로 형성된 단량체 구조의 Ig 융합단백질을 가리킨다. 연쇄 융합된 단량체 단백질은 편의상 "수용체 단백질명청-수용체 단백질 명청/Fc"로 표기할 수 있다. 예를 들면, LAG3 의세포외역 가용성 부위와 면역글로불린 Fc 단편이 결합된 단순 융합된 단량체단백질의 LAG3 의 세포외역 가용성 부위에 또 다른 LAG3 의 세포외역 가용성부위가 결합된 연쇄 융합된 단량체 단백질은 LAG3-LAG3/Fc 로표기된다. 마찬가지로, 면역글로불린 Fc 단편의 유래를 표기할 수

있다. 예를 들면, 면역글로불린 Fc 단편이 IgG1 으로부터 유래된 경우에는 LAG3-LAG3/IgG1Fc로 표기된다.

본 발명에서 "연쇄 융합된 이량체 단백질"은 연쇄 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 결합된 이량체 구조의 Ig 융합 단백질을 가리킨다. 연쇄 융합된 이량체 단백질은 편의상 "[수용체 단백질 명칭-수용체 단백질 명칭/Fc]2"로 표기할 수 있다. 예를 들면, LAG3 의 세포외역 가용성 부위와 면역글로불린 Fc 단편이 결합된 단순 융합된 단량체 단백질의 LAG3 의 세포외역 가용성 부위에 또 다른 LAG3 의 세포외역 가용성 부위가 결합된 연쇄 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 결합된 이량체 구조의 융합 단백질은 [LAG3-LAG3/Fc]2 로 표기된다. 마찬가지로, 면역글로불린 Fc 단편의 유래를 표기할 수 있다. 예를 들면, 면역글로불린 Fc 단편이 IgG1 으로부터 유래된 경우에는 [LAG3-LAG3/IgG1Fc]2로 표기된다.

10

25

한편, 단순 융합된 단량체 단백질 또는 단순 융합된 이량체 단백질은 15 모두 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 제조할 수 있으며, 연쇄 융합된 단량체 단백질 또는 연쇄 융합된 이량체 단백질은 본 발명의 발명자가 이미 출원한 바 있는 국제특허공개 WO 2003/010202 호에 기술된 제조방법을 이용하여 수득할 수 있다.

20 본 발명에 따른 연쇄 융합된 이량체 단백질은 (a) 면역글로불린 Fc 단편을 코딩하는 유전자와 수용체 단백질의 세포외역 가용성 부위를 코딩하는 유전자로부터 단순 융합된 단량체 단백질을 코딩하는 DNA 작제물을 제조하고, (b) 제조된 단순 융합된 단량체 단백질 코딩 DNA 작제물과 또 다른 수용체 단백질의 세포외역 가용성 부위를 코딩하는 유전자에 동일한 제한효소 인식서열을 중합효소 연쇄반응으로 삽입하며, (c) 상기 제한효소 인식서열과 일치하는 제한효소를 사용하여, 상기 단순 융합된 단량체 단백질 코딩 DNA

작제물과 상기 수용체 단백질의 세포외역 가용성 부위를 코딩하는 유전자의 제한효소 인식서열 부위를 절단하고, (d) 양쪽 DNA 서열의 절단된 부분을 라이게이즈로 연결하여 연쇄 융합된 단량체 단백질을 코딩하는 DNA 작제물을 제조하며, (e) 제조된 연쇄 융합된 단량체 단백질 코딩 DNA 작제물을 벡터에 작동적으로 연결하여 재조합 발현 플라스미드를 작제하고, (f) 작제된 재조합 발현 플라스미드로 숙주 세포를 형질전환 또는 형질감염시키며, (g) 형성된 형질전환체 또는 형질감염체를 연쇄 융합된 단량체 단백질 코딩 DNA 작제물이 발현되도록 하기에 적절한 조건하에서 배양하여 배양물로부터 목적하는 연쇄 융합된 이량체 단백질을 분리 정제함으로써 제조할 수 있다.

5

10

15

25

본 발명에 따른 당쇄화된 Ig 융합 단백질은 부가적인 당쇄 결합 부위를 갖도록 수용체 단백질의 세포외역 가용성 부위를 코딩하는 DNA 서열상에 O-형 또는 N-형 당쇄수식이 발생하도록 하나 이상의 뉴클레오타이드를 변이시킨 후그 DNA 를 진핵 숙주 세포를 통해 발현하면서 자연적으로 당쇄수식이 일어나도록 함으로써 제조할 수 있다. 한 가지 양태로서, 본 발명에 따른 당쇄화된 Ig 융합 단백질은 N-형 당쇄수식이 일어날 수 있는 Asn-X-Ser/Thr 서열이 부가 및/또는 증가하도록 수용체 단백질의 세포외역 가용성 부위를 코딩하는 DNA 서열을 변이시킴으로써 달성된다.

본 발명에서는 MHC Class II 분자를 포함하여 공조자극 분자로는 B7 20 분자를, 부착 분자로는 LFA-3 분자를, 사이토카인으로는 TNF를 예로서 설명하고자 한다.

"MHC Class II 분자"의 경우 이 분자와 특이적으로 결합할 수 있는 수용체에는 CD4 및 LAG3가 있다. 따라서, MHC Class II 분자와 CD4의 결합을 차단하기 위하여 LAG3의 Ig 융합 단백질을 이용할 수 있다. 구체적으로 MHC Class II 분자와 CD4의 결합을 차단할 수 있는 물질에는 (1) MHC Class II 분자의 항체; (2) 면역글로불린 Fc 단편의 힌지 부위에 LAG3의 세포외역

가용성 부위가 결합하여 형성된 단순 융합된 단량체 단백질; (3) 상기 단순 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 결합된 단순 융합된 이량체 단백질; (4) 상기 단순 융합된 단량체 단백질에서 힌지부위에 결합된 LAG3의 세포외역 가용성 부위의 N-말단에 또 다른 LAG3의 세포외역 가용성 부위의 C-말단이 결합하여 형성된 연쇄 융합된 단량체단백질; (5) 상기 연쇄 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 연결된 연쇄 융합된 이량체 단백질; (6) 상기 (2) 내지 (5)에 따른 단백질의 당쇄화된 단백질이 포함된다.

10

15

20

25

"B7 분자"의 경우 이 분자와 특이적으로 결합할 수 있는 수용체는 CD28과 CTLA4이다. 특히, B7 분자는 T 림프구의 표면상에 발현되어 있는 CD28과 결합하여 T 림프구를 활성화시키는데 반하여 또 다른 수용체인 CTLA4(T 림프구가 활성화된 이후에 발현된다)와 결합하게 되면 T 림프구의 활성화를 억제하는 것으로 알려져 있다. 따라서, B7 분자와 CD28의 결합을 차단하기 위하여 CTLA4의 Ig 융합 단백질을 이용하는 것이 바람직하다. 구체적으로 B7 분자와 CD28의 결합을 차단할 수 있는 물질에는 (1) B7 분자의 항체; (2) 면역글로불린 Fc 단편의 힌지 부위에 CTLA4의 세포외역 가용성 부위가 결합하여 형성된 단순 융합된 단량체 단백질; (3) 상기 단순 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 결합된 단순 융합된 이량체 단백질; (4) 상기 단순 융합된 단량체 단백질에서 한지 부위에 결합된 CTLA4의 세포외역 가용성 부위의 N-말단에 또 다른 CTLA4의 세포외역 가용성 부위의 C-말단이 결합하여 형성된 연쇄 융합된 단량체 단백질; (5) 상기 연쇄 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 연결된 연쇄 융합된 이량체 단백질; (6) 상기 (2) 내지 (6)에 따른 단백질의 당쇄화된 단백질이 모두 포함된다.

"LFA3 분자"의 T 림프구 활성화 기능은 LFA-3과 T 림프구 표면상의 CD2와의 결합을 차단함으로써 억제할 수 있는데 그러한 물질로는 (1) LFA-3의 항체; (2) 면역글로불린 Fc 단편의 힌지 부위에 CD2의 세포외역 가용성 부위가 결합하여 형성된 단순 융합된 단량체 단백질; (3) 상기 단순 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 결합된 단순 융합된 이량체 단백질; (4) 상기 단순 융합된 단량체 단백질에서 힌지 부위에 결합된 CD2의 세포외역 가용성 부위의 N-말단에 또 다른 CD2의 세포외역 가용성부위의 C-말단이 결합하여 형성된 연쇄 융합된 단량체 단백질; (5) 상기 연쇄융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 연결된 연쇄 융합된 이량체 단백질; (6) 상기 (2) 내지 (5)에 따른 단백질의 당쇄화된 단백질이 모두 포함된다.

"TNF"의 면역 반응 활성화 기능은 TNF 와 T 림프구 표면상의 TNFR 의결합을 차단함으로써 억제할 수 있는데 그러한 물질로는 (1) TNF 의 항체; (2) 면역글로불린 Fc 단편의 힌지 부위에 TNFR 의 세포외역 가용성 부위가결합하여 형성된 단순 융합된 단량체 단백질; (3) 상기 단순 융합된 단량체단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 결합된 단순 융합된이량체단백질; (4) 상기 단순 융합된 단량체단백질에서 힌지 부위에 결합된TNFR 의 세포외역 가용성부위의 N-말단에 또 다른 TNFR 의 세포외역 가용성부위의 C-말단이 결합하여 형성된 연쇄 융합된 단량체단백질; (5) 상기 연쇄융합된 단량체단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 연결된연쇄 융합된 이량체단백질; (6) 상기 (2) 내지 (5)에 따른 단백질의 당쇄화된단백질이 모두 포함된다.

#### III. 면역질환

5

10

15

20

본 발명에 따른 활성 성분은 T 림프구의 활성화를 억제할 수 있기 25 때문에 원치 않는 T 림프구의 활성으로 인하여 유발되는 각종 질병을 치료하는데 이용할 수 있다. 그러한 질병의 대표적인 예로는 장기 이식 합병증과 자가면역 질환이 있다.

"장기이식 합병증(Transplantation Rejection)"이란, 이식편(이식되는 생체의 일부로 세포, 조직 또는 장기)의 공여자와 수령자간의 유전적 배경이 상이하여 (1) 공여자의 이식편 유래 면역 세포가 수령자를 외부물질로 인식하여 공격함으로써 유발되는 질환(즉, 이식편대 숙주질환) 및 (2) 수령자가 공여자의 이식편을 외부물질로 인식하여 공격함으로써 유발되는 질환(즉, 이식편 거부반응)을 의미한다.

한편, 면역 세포가 자신과 이물질을 구별하지 못하고 자신을 공격하여 발생하는 질병을 자가면역 질환이라고 통칭하는데 구체적으로, 류마티스 관절염(Rheumatoid Arthritis), 다발성 경화증((Multiple Sclerosis), 증증 근무력증(Myasthenia gravis), 그레브스 병(Grave's Disease), 하시모토씨 감상선염(Hashimoto's Thyroiditis), 애디슨병(Addison's Disease), 백반증(Vitilligo), 경피증(Scleroderma), 굿패스쳐 신드롬(Goodpasture syndrome), 베제트병(Becet's Disease), 크론병(Crohn's Disease), 강직성 착추염(Ankylosing Spondylitis), 포도막염(Uveitis), 혈소판 감소성 자반증(Thrombocytopenic purpura), 심상성 천포창(Pemphigus vulgaris), 소아 당뇨병(Diabetes), 자가면역성 용혈성 빈혈(Autoimmune Anemia), 크라일로글로불린증(Cryoglobulinemia), 부신백질이영양증(ALD), 전신성 흥반성 낭창(Systemic Lupus Erythematosus, SLE) 등이 있다.

20

25

5

10

15

#### IV. 약제학적 조성물

본 발명의 약제학적 조성물은 MHC Class II 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질, 공조자극 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질, 부착 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질 및 사이토카인과 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질로 이루어진 그룹으로부터 2종 이상 선택된 활성 성분을 치료학적 유효량으로 약제학적으로 허용되는 담체에 혼입시킨 형태로 제공하는 것이 바람직할 것이다.

1

10

15

20

25

본 발명의 약제학적 조성물에 사용되는 담체는 제약 분야에서 통상 사용되는 담체, 보조제 및 비히클을 포함하며 총괄적으로 "약제학적으로 허용되는 담체"라고 한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 사용될 수 있는 약제학적으로 허용되는 담체로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 이온 교환, 알루미나, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완충 물질(예, 여러 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소캄륨, 염화나트륨 및 아연 염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈-계기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌-폴리옥시프로필렌-차단 중합체, 폴리에틸렌 글리콜 및 양모지 등이 포함된다.

본 발명의 약제학적 조성물은 목적하는 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 따라서 본 발명의 약제학적 조성물은 국부, 경구, 비경구, 안내, 경피, 직장, 장관 등으로 투여될 수 있고, 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다. 본 발명의 명세서에서 사용된 용어 "비경구"는 피하, 비내, 정맥내, 복강내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 심장내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입 기술을 포함한다.

한 양태로서, 본 발명의 약제학적 조성물은 비경구적 투여를 위한 수용성 용액으로 제조할 수 있다. 바람직하게는, 한스 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 적절한 완충 용액을 사용할 수 있다. 수용성 주입(injection) 현탁액은 소디움 카르복시메틸셀룰로즈, 솔비톨 또는 덱스트란과 같이 현탁액의 점도를

증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다. 덧붙여서, 활성성분의 현탁액은 적합한 유질의 주입 현탁액(oily injection suspension)으로 적합한 친지성 용매 또는 담체는 참기름과 같은 지방산 또는 에틸 올레이트, 트리글리세라이드 또는 리포솜과 같은 합성 지방산 에스테르를 포함한다. 복수 양이온성 비지질 아미노 폴리머(polycationic amino polymers)도 운반체로서 사용될 수 있다. 임의로, 현탁엑은 화합물의 용해도를 증가시키고 고농도의 용액을 제조하기 위해 적합한 안정화제 또는 약제를 사용할 수 있다.

본 발명의 바람직한 약제학적 조성물은 멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁액으로서 멸균 주사용 제제의 형태일 수 있다. 이러한 현탁액은 적합한 10 분산제 또는 습윤제(예, 트윈 80) 및 현탁화제를 사용하여 본 분야에 공지된 기술에 따라 제형화될 수 있다. 멸균 주사용 제제는 또한 무독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매 중의 멸균 주사 용액 또는 현탁액(예, 1,3-부탄디올 중의 용액)일 수 있다. 사용될 수 있는 비히클 및 용매로는 만니톨, 물, 링거 용액 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 멸균 비휘발성 오일이 통상적으로 용매 또는 현탁화 매질로서 사용된다. 이러한 목적을 위해, 합성 모노 또는 디글리세라이드를 포함하여 자극성이 적은 어떠한 비휘발성 오일도 사용할 수 있다. 올레산 및 이의 글리세라이드 유도체와 같은 지방산이 약제학적으로 허용되는 천연 오일(예, 올리브유 또는 피마자유), 특히 이들의 폴리옥시에틸화된 것과 마찬가지로 주사 제제에 유용하다.

15

20

25

앞서 제조된 액상 조성물은 박테리아 포획 필터 등을 통한 여과에 의해 살균제 또는 방사를 혼입시켜 대개 살균된다. 살균된 조성물은 예를 들면 동결건조에 의해 고형 조성물을 수득하여 고형화시킬 수 있으며, 사용시에 이를 무균수 또는 무균 희석액에 용해시킨다.

본 발명에 따른 활성 성분을 함유한 약제학적 조성물은 실온에서의

안정성을 증가시키고, 값비싼 저온 저장의 필요성을 줄이며, 저장 수명(shelf-life)을 연장하기 위해 동결건조시킬 수 있다. 동결건조 공정은 동결, 일차건조 및 이차 건조의 연속 단계로 이루어질 수 있다. 조성물을 동결시킨 후의이차 건조 공정은 압력을 강하하고 수증기의 승화를 위해 가열하는 것이다. 이차 건조 단계는 건조물로부터 흡수된 잔여 수분을 증발시키는 것이다.

본 발명의 약제학적 조성물과 관련하여 사용되는 용어 "치료학적 유효량"은 본 발명의 조성물이 적용되는 면역질환에 대하여 목적한 개선 또는 치료 효과를 달성할 수 있는 활성 성분의 양을 의미한다. 구체적으로 본 발명에서 치료학적 유효량은 환자의 연령, 성별, 적용부위, 투여회수, 투여시간, 제형, 보조제의 종류 등에 따라 변할 수 있지만, 예를 들면  $0.01\sim1000\mu g/kg/일$ , 보다 바람직하게는  $0.1\sim500\mu g/kg/일$ , 가장 바람직하게는  $1\sim100\mu g/kg/일$ 로 투여한다.

15 본 발명은 하기 실시예를 통해 보다 구체적으로 설명될 것이다. 그러나 이들 실시예는 단순히 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업자에게 있어서 자명할 것이다.

20 하기 실시예 1은 LAG3에 관한 것이며, LAG3/Fc 또는 LAG3-LAG3/Fc의 아미노산 서열 및 코딩 DNA 서열 그리고 이들의 제조에 이용된 프라이머 서열들을 하기 표 1에 요약하였다.

10

<표 1>
LAG3-LAG3/Fc 서열 및 이의 제조에 이용된 프라이머 서열

í

서열 명칭	서 열	ابر (ر
	번 호	설 명
Oligo-LAG3-F- <i>Eco</i> R I	1	LAG3 세포외역 가용성 부위의 5'말단, <i>Eco</i> R I 포함
Oligo-LAG3-R-5P	2	LAG3 세포외역 가용성 부위의 3'말단
Oligo-LAG3-F-5P	3	LAG3 세포외역 가용성 부위의 5'말단
Oligo-LAG3-R- <i>Spe</i> I	4	LAG3 세포외역 가용성 부위의 3'말단, Spe I 포함
hIgG-F- <i>Spe</i> I	5	IgG 힌지 5'말단 Spe I 포함
hIgG-R- <i>Xba</i> I	6	IgG 3'말단 Xba I 포함
LAG3/Fc 코딩 DNA	7	_
LAG3/Fc 단백질	8	_
LAG3-LAG3/Fc 코딩 DNA	9	_
LAG3-LAG3/Fc 단백질	10	_

(

# 5 <실시예 1>

본 발명에 따른 Ig 융합 단백질을 코딩하는 DNA 작제물의 제조

- A. 단순 융합된 단량체 단백질 LAG3/Fc를 코딩하는 DNA 작제물의 제조
- a. LAG3의 세포외역 가용성 부위를 코딩하는 DNA 단편

LAG3의 세포외역 가용성 부위를 코딩하는 DNA 단편은, 제한효소 10 EcoRI의 인식서열과 리더서열(서열번호 8의 펩타이드 1-22)의 코딩서열(서열번호 7의 뉴클레오타이드)을 갖는 한 프라이머(서열번호 1의 뉴클레오타이드)와, 제한효소 SpeI의 인식서열과 상기 세포외역 가용성 부위의 3'말단 서열을 코딩하는 안티센스 서열(서열번호 7의 뉴클레오타이드)을 갖는 다른 프라이머(서열번호 4번의 뉴클레오타이드)를

사용하여 중합효소 연쇄반응으로 생성시켰다. 이 반응을 위한 주형 cDNA는 건강한 성인의 단핵구 세포(T림파구)에서 추출한 mRNA를 역전사-중합효소 연쇄반응을 이용하여 제조하였다.

건강한 성인의 혈액을 채취하여 알피엠아이-1640[RPMI-1640(Gibco BRL, USA)] 배지와 1:1로 희석하고 이를 피콜-하이팩 [Ficoll-hypaque(Amersham, USA)]을 사용하여 밀도구배 원심분리(density-gradient centrifugation)하여 상부에 형성된 T 림프구 세포층을 얻었다. 그리고 알피엠아이-1640 배지로 3회 세척하고 여기에 10% 우태아혈청(FBS, Gibco BRL,5 USA) 함유 알피엠아이-1640 배지를 가하여 T 림프구 세포가 5× 10<sup>5</sup>개/ml로 하고, 파이토헤마굴루티닌-엠[Phytohemagglutinin-M (Calbiochem, Germany)]을  $2\mu g/m \ell z$  첨가하여 자극하였다.

10

15

20

25

mRNA는 트리리에이젠트 [Tri-Reagent(MRC, USA)] mRNA 분리 키트를 이용하여 순수 분리하였다. 우선 인간 T 림프구 2× 10<sup>7</sup>개의 세포를 인산위충 생리식염수용액(phosphate buffered saline, PBS, pH7.2)으로 3회 세척한 후 1ml 트리리젠트로 수차례 섞어서 RNA를 용해시켰다. 이 튜브에 0.2ml 클로로포름(chloroform)을 첨가하여 강하게 흔들어준 후, 실온에서 15분간 방치한 다음, 4℃에서 15,000rpm으로 15분간 원심분리하였다. 상층액을 1.5mℓ 튜브로 옮기고 0.5㎖ 이소프로판올(isopropanol)을 첨가한 후, 4℃에서 15,000rpm으로 15분간 원심 분리하였다. 상층액을 버린 후, 침전물에, 75% 에탄올(Ethanol)-25% 디이피씨[DEPC(Sigma, USA)]를 처리한 3차 증류수를 1㎖ 첨가하여 2~3회 섞은 후 4℃에서 15,000rpm으로 15분간 원심 분리하였다. 상층액을 완전히 제거하고 공기 중에서 건조시켜 잔여 에탄올을 제거한 후 RNA를 디이피씨를 처리한 3차 증류수 50㎡로 녹였다.

cDNA 합성은 1.5ml 튜브에 정제된 2μg mRNA와 1μl 올리고 디티[oligo dT(dT30, Promega, USA)] 프라이머를 10μM의 농도로 혼합하고, 70℃에서 2분간 가열한 후, 얼음에 넣어 2분간 냉각시켰다. 이 혼합물에 200U 엠-

엠엘브이(M-MLV) 역전사효소[reverse transcriptase(Promega, USA)],  $10\mu$  5× 반응완충용액(reaction buffer) [250mM 트리스-에이치씨엘(Tris-HCl), pH 8.3, 375mM 염화칼륨(KCl), 15mM 염화마그네슘(MgCl<sub>2</sub>), 50mM 디티티(DTT)],  $1\mu$  디엔티피[dNTP(각각 10mM의 농도, Takara, Japan)]를 넣고 디이피씨를 처리한 3차 증류수로  $50\mu$ 가 되도록 첨가한 후, 42℃에서 1시간 반응시켜 1차 cDNA를 합성하였다.

# b. 면역글로불린 G1의 Fc 단편을 코딩하는 DNA 단편

5

20

면역글로블린 G1의 Fc 단편을 코딩하는 DNA 단편은, 제한효소 Spe I 의 인식서열과 IgG1의 힌지의 5' 말단을 코딩하는 서열을 갖는 한 프라이머(서열번호 5의 뉴클레오타이드)와 Xba I 의 인식서열과 IgG1 Fc의 3' 말단을 코딩하는 안티센스의 서열을 갖는 다른 프라이머(서열번호 6번의 뉴클레오타이드)를 사용하여 중합효소 연쇄반응으로 생성시켰다. 이 반응을 위한 주형 cDNA는 회복기에 있는 원인 불명의 열 환자의 말초 혈액세포(B 림파구)에서 추출한 mRNA를 역전사-중합효소 연쇄반응을 이용하여 제조하였다.

# c. 단순 융합된 단량체 단백질 LAG3/Fc를 코딩하는 DNA 작제물

상기 생성된 LAG3의 세포외역 가용성 부위를 코딩하는 DNA 단편과 면역글로브린 G1의 Fc 단편을 코딩하는 DNA 단편을 제한효소 *Spe* I 으로 소화시키고 티포 디엔에이 라이게이즈(T₄ DNA ligase, USB, USA)를 이용하여 결합시킴으로써 단순 단량체 형태의 LAG3/Fc 유전자를 제작하였다.

- d. 단순 융합된 단량체 단백질 LAG3/Fc를 코딩하는 DNA 작제물의 클로닝
- 25 상기 제조된 단순 융합된 단량체 단백질 LAG3/Fc를 코딩하는 DNA 작제물을 제한효소 EcoRI과 XbaI으로 소화시키고, 시판되고 있는 클로닝

벡터(Stratagene사 제품) 피블루스크립트 케이에스투 플러스[pBluescript KS II(+)]의 EcoRI/XbaI 부위에 삽입하여 클로닝하였다. 전체 코딩 영역 서열을 DNA 서열화에 의해 확인하였다(서열번호 7). 이때 생성된 융합 단백질은 단순 융합된 단량체 단백질로서 LAG3/Fc라 명명하였고, 이들의 추정 아미노산 5 서열은 서열번호 8에 해당한다.

B. 연쇄 융합된 단량체 단백질 LAG3-LAG3/Fc를 코딩하는 DNA 작제물의 제조

10

15

20

LAG3의 세포외역 가용성 부위가 연쇄체(concatamer)의 형태를 갖는 융합된 유전자를 만들기 위해, 즉 연쇄 융합된 단량체 단백질 LAG3-LAG3/Fc를 코딩하는 DNA 작제물을 만들기 위해, 제한효소 EcoRI의 인식서열과 펩타이드 1-22)의 코딩서열(서열번호 7의 리더서열(서열번호 8의 뉴클레오타이드)을 갖는 한 프라이머(서열번호 1의 뉴클레오타이드)와 상기 세포외역 가용성 부위의 3' 말단 서열을 코딩하는 안티센스 서열(서열번호 7의 뉴클레오타이드)을 갖는 다른 프라이머(서열번호 2의 뉴클레오타이드)를 사용하여 하나의 LAG3 세포외역 가용성 부위의 단편을 증폭하였고, 또한 LAG3 세포외역 가용성부위의 리더 서열이 종료되는 부위(서열번호 뉴클레오타이드)을 갖는 한 프라이머(서열번호 3의 뉴클레오타이드)와 제한효소 Xba I 의 인식서열과 IgG1 Fc의 3'말단을 코딩하는 안티센스 서열을 갖는 다른 프라이머(서열번호 6의 뉴클레오타이드)를 사용하여 다른 단순 융합된 단량체 단백질 LAG3/Fc를 코딩하는 단편을 증폭하였다. 이 반응은 상기 제조된 단순 융합된 단량체 단백질 LAG3/Fc를 코딩하는 DNA 작제물(서열번호 7의 뉴클레오타이드)을 주형으로 사용하였다.

중합효소 연쇄반응은 1 $\mu$ l 1차 cDNA, 2U 피에프유(Pfu) DNA 25 중합효소[polymerase (Stratagene, USA)], 10 $\mu$ l 10X 반응완충용액(reaction buffer) [200mM 트리스-HCI, pH8.75, 100mM 황산암모늄 [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>], 100mM

염화칼륨(KC1), 20mM 염화마그네슘(MgCl<sub>2</sub>)], 1% 트리톤(등록상표 Triton) X-100, 1mg/ml 우혈청알부민(BSA), 3μl 프라이머1(10 μ M), 3μl 프라이머2(10 μ M), 2μl 디엔티피(dNTP, 각각 10mM)를 넣고 3차 증류수로 100μl가 되도록 첨가한 후 실시하였다. 반응 조건은 94℃에서 5분 동안 처리한 다음 95℃ 1분, 58℃ 1분30초, 72℃ 1분30초씩 31회 반응시키고, 72℃ 15분간 더 반응시켜 중합효소 연쇄반응 산물이 완전한 평활 말단(blunt end)이 되도록 하였다.

중합효소 연쇄반응 산물들을 0.8% 아가로즈 젤(agarose gel)에 전기영동한 후, 큐엑스 투 젤 추출 키트[Qiaex II gel extraction kit(Qiagen, USA)]를 이용하여 순수 분리하였다. 순수분리된 중합효소 연쇄반응 산물들을 제한효소 BamHI으로 처리한 후 페놀/클로로포름 추출 방법으로 순수분리하였다. 이어서, BamHI으로 처리된 두 종류의 DNA 단편을 라이게이즈로 결합시켰다.

10

20

25

C. 연쇄 융합된 단량체 단백질 LAG3-LAG3/Fc를 코딩하는 DNA 작제물의 15 클로닝

상기 제조된 연쇄 융합된 단량체 단백질 LAG3-LAG3/Fc를 코딩하는 DNA 작제물을 제한효소 EcoRI과 XbaI으로 소화시키고, 시판되고 있는 클로닝백터인 피블루스크립트 케이에스투 플러스[pBluescript KSII(+), Stratagene, USA)]의 EcoRI/XbaI 부위에 삽입하여 클로닝하였다. 전체 코딩 영역 서열을 DNA 서열화에 의해 확인하였다(서열번호 9). 이때 생성된 융합 단백질은 연쇄융합된 단량체 단백질로서 LAG3-LAG3/Fc라 명명하였고, 이들의 추정 아미노산서열은 서열번호 10에 해당한다.

벡터로 사용할 10㎡ 피블루스크립트 케이에스투 플러스[pBluescript KS П (+), Stratagene, USA)]를 15U EcoRI과 15U XbaI,  $5\mu\ell$ 10X 반응완충용엑(reaction buffer) [100mM 트리스-HCI, pH 7.5, 100mM 염화마그네슘(MgCl2), 10mM 디티티 (DTT), 500nM 염화나트륨(NaCl)], 5μl 0.1%

우혈청알부민[BSA(Takara, Japan)]을 섞은 후, 3차 증류수로 50此가 되도록 첨가한 후 37℃에서 2시간 반응시켜 DNA를 소화시켰다. 반응물을 0.8% 아가로즈 겔에 전기영동한 후, 큐엑스 투 젤 추출 키트 [Qiaex Ⅱ gel extraction kit(Qiagen, USA)]로 순수 분리하였다.

:-

5

10

15

20

25

EcoRI과 Xbal으로 소화된 피블루스크립트 케이에스투 플러스[pBluescript KS Ⅱ(+), Stratagene, USA] 100ng과 제한효소로 소화시킨 중합효소 연쇄반응 20ng의 산물을 혼합하고 0.5U 티포(T4) 라이게이즈[ligase(Amersham, USA)], 1此 10X반응완충용액(reaction buffer) [300mM 트리스-에이치씨엘(Tris-HCl), pH 7.8, 100mM 염화마그네습(MgCl<sub>2</sub>). 100mM 디티티(DTT), 10mM 에이티피(ATP)]를 넣은 후 3차 증류수로 10μl가 되도록 첨가한 후 16℃ 수조(water bath)에서 16시간 동안 반응시켰다.

한편, 대장균[E. coli Top10(Novex, USA)]을 리비듐 클로라이드(RbCl, ribidium chloride, Sigma, USA)법으로 컴피턴트 세포(competent cell)를 만든후 앞서 제조된 플라스미드로 형질전환시켜 암피실린(ampicillin, Sigma, USA)을 50μg/ml 함유한 엘비(LB) 고체 배지에 도말하고 37℃에서 16시간배양하였다. 생성된 콜로니들을 암피실린이 50μg/ml 함유된 엘비(LB)액체배지 4ml에 접종한 후 37℃에서 16시간동안 진탕 배양하였다. 이 중1.5ml을 샘브룩(Sambrook J) 등의 문헌(Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p1.25-1.31, p1.63-1.69, p7.26-7.29, 1989)에 기술된 알칼리 분해(alkaline lysis)법으로 플라스미드를 소량 추출한 후, EcoRI과 XbaI으로 소화시켜 클로닝의 유무를 확인하였다.

전체 코딩영역 서열은 다이데옥시 체인 터미네이션 [Dideoxy chain termination (Sanger F. et al. PNAS USA, 1977, vol.74, p.5483)] 법을 이용한 다음과 같은 DNA 서열화 방법에 의해 확인하였다. 상기의 알칼리분해법으로 추출한 플라스미드와 시쿼네이즈(등록상표 Sequenase ver. 2.0, Amersham, USA) 및 35S 디에이티피(dATP, Amersham, USA)를 사용하여 제품

사용법에 준하는 방법으로 DNA 서열화 반응을 진행시켰다. 6% 폴리아크릴아미드 젤(polyacrylamide gel)에 위의 시료를 로딩(loading)하고 전압을 1800~2000V 사이로 유지하여 젤의 온도를 50℃로 유지하면서 2시간 전기영동한 후, 건조시킨 다음 엑스레이 필름(Kodak, USA)에 2일 동안노출시킨 후 DNA 염기 서열을 판독하였다.

<실시예 2>

본 발명에 따른 Ig 융합 단백질을 코딩하는 DNA 작제물의 제조

다른 단백질인 TNFR1, TNFR2, CD2 또는 CTLA4의 단순 융합된 이량체 단백질 및 연쇄 융합된 이량체 단백질은 전술한 실시예 1과 동일한 절차에 따라 제조할 수 있다. 보다 자세한 제조방법은 본 발명의 발명자가 이미 출원한 바 있는 국제특허공개 WO 2003/010202호를 통하여 확인할 수 있다. 관련된 TNFR1, TNFR2, CD2 또는 CTLA4 서열들을 아래 표 2에 15 나타내었다.

<표 2> 본 발명에 따른 Ig 융합 단백질 및 이의 코딩 서열

서열 명칭	서열번호
TNFR2/Fc 코딩 DNA	11
TNFR2/Fc 단백질	12
TNFR2-TNFR2/Fc 코딩 DNA	13
TNFR2-TNFR2/Fc 단백질	14
CD2/Fc코딩 DNA	15
CD2/Fc 단백질	16
CD2-CD2/Fc 코딩 DNA	17
CD2-CD2/Fc 단백질	18
CTLA4/Fc 코딩 DNA	19
CTLA4/FC 단백질	20
CTLA4-CTLA4/FC 코딩 DNA	21
CTLA4-CTLA4/FC 단백질	22
TNFR1/Fc 코딩 DNA	23
TNFR1/Fc 단백질	24
TNFR2-TNFR1/Fc 코딩 DNA	25
TNFR2-TNFR1/Fc 단백질	26

# 5 <실시예 3> 단순/연쇄 융합된 이량체 LAG3 융합 단백질의 발현 및 정체

챠이니즈 헴스터 난소 세포주 케이원(CHO-K1, ATCC CCL-61, Ovary, Chinese hamster, Cricetulus griseus)에서 융합 단백질을 발현시키기 위하여,

LAG3-LAG3/Fc 융합 유전자를 포함한 블루스크립트 케이에스투 플러스 플라스미드를 형질 전환된 대장균에서 추출한 후, 제한효소 EcoRI과 XbaI으로 소화시켜 얻은 LAG3-LAG3/Fc 단편을 동물세포 발현 벡터인 피씨알쓰리(pCR™3, Invitrogen, USA) 플라스미드의 EcoRI/XbaI 부위에 삽입하여, 재조합 발현 플라스미드를 pLAG33Ig를 제조하였다(도 3). 이 플라스미드를 pLAG33-Top10'이라 명명하였고, 2004년 1월 13일자로 국제기탁기관인 한국미생물보존센터 (KCCM, 대한민국 서울시 서대문구 홍제 1동 361-221 유림빌딩 소재)에 기탁번호 KCCM-10556로 기탁하였다.

5

10

15

20

형질 감염은 상기 LAG3-LAG3/Fc 융합 유전자를 포함한 플라스미드 pLAG33Ig DNA를 지브코 비알엘(Gibco BRL, USA)사의 리포펙타민(LipofectamineTM) 시약과 혼합함으로써 수행하였다.  $1 \sim 3 \times 10^{5}$ 세포/구의 농도의 챠이니즈 햄스터 난소 세포주 케이원(CHO-K1) 세포를 6구 조직 배양판 (six-well tissue culture plate, Nunc, USA)에 접종하고 10% 우태아혈청(FBS)을 함유한 디엠이엠(DMEM) 배지에서 세포가 50~80%가 되도록 배양한 후, 혈청이 없는 디엠이엠(DMEM) 배지에서 플라스미드 pLAG33Ig DNA를  $1\sim 2\mu\mathrm{g}$  취하고, 리포펙타민(Gibco BRL,USA)을  $2\sim 25\mu\mathrm{l}$  취하여 상온에서 15~45분간 반응시킨 DNA-리포좀 혼합체(Liposome complex)를 세포 배양판에 첨가시켰다. 5시간동안 배양한 후 혈청이 20%가 함유된 디엠이엠(DMEM) 배지를 첨가하여 18~24시간 배양하였다. 최초 형질 감염 후에 세포를 1.5 mg/ml의 제네티신(Geneticin, G418, Gibco BRL, USA)이 첨가된 10% 우태아혈청 디엠이엠(DMEM) 배지에서 3주간 배양하고, 형성된 집락을 분리하여 증폭 배양하였다. 융합 유전자의 발현 여부는 퍼옥시데이즈가 표지된 염소 항 인간 면역글로블린(Peroxidase labeled goat anti-human IgG, KPL, USA)을 사용한 효소 면역 검사법(ELISA)을 통해 검사하였다.

25 효소 면역 검사법(ELISA)은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 먼저, lmg/ml 염소 항 인간 면역 글로블린(Peroxidase labeled goat anti-human IgG,

KPL, USA)을 0.1M 중탄산나트륨(sodium bicarbonate)에 1:2000으로 희석한 후. 96구 효소 면역 검사판(96-well flexible plate, Falcon, USA)에 100㎡씩 분주하고 랩으로 봉한 후 4℃에서 16시간 이상 방치하여 항체가 검사판 표면에 코팅되게 하였다. 이를 세척완충용액(washing buffer) [0.1% 트윈-20(Tween-20) 함유, 1X 인산완충 생리식염수(PBS, Phosphate buffered saline)]으로 3회 세척한 후 희석용액[(diluent buffer) 1X 인산완충 생리식염수 48.5㎡, 우태아 혈청 1.5㎖, 트윈-20 50㎖]을 180㎖씩 분주하였다. 첫 구(well)에 배양한 상층액 20μℓ를 넣은 후 마이크로 피펫 (micropipette)을 이용하여 연속적으로 희석하였고, 양성 대조군으로  $0.01\mu\mathrm{g}/\mu\mathrm{l}$  인간 면역글로블린(human IgG, Sigma, 대조군으로 형질감염되지 않은 챠이니즈 햄스터의 난소 USA)을, 음성 케이원(CHO-K1) 세포의 배양액을 사용하여 동일하게 희석하였다. 희석이 끝난 96구 효소 면역 검사판(Falcon, USA)을 호일로 싸서 37℃에서 1시간 30분간 반응시킨 후, 세척용액으로 3회 세척하였다. 퍼옥시데이즈가 표지된 염소 항-인간 면역글로블린(Peroxidase labeled goat anti-human IgG, KPL, USA)을 희석용액으로 1:5000 희석한 다음 이를 100㎡씩 분주하고 호일로 싼 후 37℃에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 세척용액으로 3회 세척한 후 티엠비 퍼옥시데이즈 시스템(TMB microwell peroxidase substrate system, KPL, USA)을 이용하여 발색시키고, 흡광기(microplate reader, Bio-RAD, Model 550, Japan)로 파장 630nm에 대한 흡광도를 측정하여 발현 여부를 확인하였다.

10

15

20

25

이렇게 제조된 형질전환체(transfectant)가 생산한 융합 단백질을 경제할 목적으로 무혈청배지(serum free media) 중 CHO-S-SFM Ⅱ (Gibco BRL, USA)에 적응시키기 위하여 다음의 과정으로 진행하였다. 약 3× 10<sup>5</sup>개의 세포를 6구판(6-well plate)에 접종한 후 16시간동안 5% CO<sub>2</sub> 37℃ 배양기에서 배양하여 정착시킨 후 현미경 하에서 약 30~50%의 면적에 세포가 부착된 것을 확인하고 10% 우태아 혈칭 함유 DMEM와 CHO-S-SFM Ⅱ의 비율을 8:2가 되도록 배지를 교체하여 배양하였다. 이 비율로 3회 계대 배양한 후, 각각 6:4의

비율로 3회, 4:6의 비율로 3회, 3:7의 비율로 3회, 2:8의 비율로 3회, 및 1:9의 비율로 3회 계대 배양한 후 최종적으로 100% CHO-S-SFM Ⅱ 배지에서 계대 배양하여, 이의 발현량을 효소 면역 검사법을 이용하여 측정하였다.

이 세포들을 우혈청배지가 없는 CHO-S-SFM Ⅱ(Gibco BRL, 배지에서 대량 배양후 각각의 융합 단백질을 함유한 배양액을 200× g, 12분간 5 원심분리하여 세포 찌꺼기들을 완전히 제거하고 프로테인 에이 컬럼(HiTrap protein A column, Amersham, USA)을 이용한 다음의 방법으로 분리하였다. 20mM 인산화 나트륨(Sodium phosphate, pH 7.0, Sigma, USA)을 lml/min의 속도로 2분간 통과시킨 후, 10ml 배양액을 동일한 속도로 컬럼을 통과시켜 프로테인 에이에 융합 단백질이 결합하도록 하였다. 20mM 인산화 10 나트륨(pH 7.0)을 2분간 동일 속도로 통과시켜 세척한 후. 시트르산(C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> . H<sub>2</sub>O. citric acid, pH 3.0, Sigma, USA)을 3분간 동일속도로 통과시키면서 500 $\mu$ l씩 1.5ml 튜브에 순차적으로 추출물을 분주하였다. 1M 트리스(Tris, pH 11.0, USB, Sigma)를 이용하여 pH 7.0으로 적정하였으며 각 튜브의 융합 단백질의 존재 유무는 상기에 기술한 효소면역 검사법(ELISA)을 통하여 확인하였다. 순수 분리한 융합 단백질은 센트리콘 30(Centricon 30, Amicon, USA)을 사용하여 4℃에서 2000× g, 30분간 원심분리하여 농축하였다.

20 <실시예 4>

15

단순/연쇄 융합된 이량체 단백질 CD2, CTLA4, TNFR의 발현 및 정제

단순/연쇄 융합된 이량체 단백질 CD2, CTLA4, TNFR의 발현 및 정제는 전술한 실시예 3과 동일한 절차에 따라 제조할 수 있었다. 보다 자세한 방법은 본 발명의 발명자가 이미 출원한 바 있는 국제특허공개 25 2003/010202호를 통하여 확인할 수 있다. 한편, 이로부터 수득한 제조합 발현

플라스미드는 각각 pCD22Ig(도 1), pCT44Ig(도 2), pTR2Ig-Top'(도 4)이라 명명하였다.

아울러, 실시예 3 및 실시예 4에 따라 순수 정제된 단백질들이 목적한 단순 융합된 이량체 단백질 [CD2/Fc]<sub>2</sub>, [LAG3/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4/Fc]<sub>2</sub> 및 연쇄 융합된 이량체 단백질 [CD2-CD2/Fc]<sub>2</sub>, [LAG3-LAG3/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4-CTLA4/Fc]<sub>2</sub>가 맞는지 여부를 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 실시하였고 (도 5a), 마찬가지로 [TNFR1/Fc]<sub>2</sub>, [TNFR2/Fc]<sub>2</sub>, [TNFR2-TNFR1/Fc]<sub>2</sub>, [TNFR2-TNFR2/Fc]<sub>2</sub>에 대해서도 SDS-PAGE를 실시하였다(도 5b).

#### 10 <실시예 5>

20

25

단순 융합된 이량체 단백질 또는 연쇄 융합된 이량체 단백질의 단독 또는 복합 처리에 따른 T 림프구의 증식 억제 효과 확인

A. 단순 융합된 이량체 단백질의 단독 처리에 따른 T 림프구의 증식 15 억제 효과 확인

발열 환자의 B 림프구에 엡스타인-바 바이러스(Ebstein-Barr virus)를 형질감염시켜 만든 B 림프구 세포주인 WT100B1S를 T 림프구의 항원제시세포로 사용하기 위하여 10% 우태아 혈청 함유 알피엠아이(RPMI) 1640에 배양하였다. 이를 2,000rpm에서 2분간 침전시킨 후  $5.0 \times 10^5/\text{ml}$ 이 되도록 10% 우태아 혈청 함유 알피엠아이(RPMI) 1640에 다시 푼 다음 3,000 라드(rd)의 감마선(ɣ-ray)으로 조사(irradiation)시켰다.

T 림프구는 건강한 사람의 혈액에서 피콜-하이팩 [Ficoll-hypaque (Amersham, USA)]을 이용하여 분리한 다음  $2.0 \times 10^6$ 세포/ml이 되도록 10% 우태아 혈청 함유 알피엠아이(RPMI) 1640으로 배양하였다.

1차 혼합 림프구 반응[Primary Mixed Lymphocyte Reaction(MLR)]을 실행하기 위하여 상기 WT100B1S와 T 림프구를 150mm 세포 배양 접시에 각각 15㎡씩 섞고 3일간 배양한 후에 15㎡의 10% 우태아 혈청 함유 알피엠아이(RPMI) 1640을 첨가하여 3일간 더 배양하였다. 총 6일간 배양한 후에 상기의 방법대로 피콜-하이팩 [Ficoll-hypaque (Amersham, USA)]을 이용하여 살아있는 T 림프구를 순수 분리하였다. 이렇게 분리한 림프구는 45% 우태아 혈청, 45% 알피엠아이(RPMI) 1640, 10% 디엠에스오(DMSO)로 만든 배지를 이용하여 얼린 후 액체질소에 보관하였다.

5

10

15

20

25

1차 혼합 림프구 반응을 시킨 T 림프구를 2차 혼합 림프구 반응을 실시하기 위하여 녹인 후, 알피엠아이(RPMI) 1640 배지를 이용하여 2회 세척하였고 10% 우태아 혈청 함유 알피엠아이(RPMI) 1640에  $3.0 \times 10^5 \text{cells/ml}$ 이 되도록 하였다.

항원제시세포로 사용할 WT100B1S는 상기의 방법대로 새로 배양한 후 3,000라드의 감마선(ɣ-ray)으로 조사(irradiation)시켜 준비하고 7.5×10⁴cells/mℓ이 되도록 10% 우태아 혈칭 함유 알피엠아이(RPMI) 1640에 준비하였다. 이렇게 준비된 WT100B1S를 100μℓ씩 96구 평판 세포 배양판에 넣고 단순 융합된 이량체 단백질 [TNFR2/Fc]₂, [CD2/Fc]₂, [CTLA4/Fc]₂, [LAG3/Fc]₂을 각각 최종 농도 10, 1, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴μg/mℓ가 되도록 혼합한 후 상기 1차 혼합 림프구 반응을 시킨 T 림프구를 100μℓ씩 첨가하였다. 이를 5% CO₂ 37℃ 배양기에서 2일간 배양한 후, 10% 우태아 혈칭 함유 알피엠아이(RPMI) 1640를 100μℓ 첨가하고 2일간 더 배양하였다. 총 4일간의 배양 중 마지막 6시간은 ³H-타이미딘 [thymidine(Amersham)]을 1.2μCi/mℓ가 되도록 첨가하여 배양하였다.

배양이 종료된 후 96구 세포 배양판을 4℃, 110×g, 10분간 원심 분리하여 T-림프구를 침전시켜 상층액을 제거하였고, 200ℓ 1X 인산완충용액으로 세척하였다. 동일한 조건으로 원심 분리한 후 인산완충용액을 제거하고, 남아있는 <sup>3</sup>H-타이미딘 [thymidine (Amersham)]을 제거하기 위해 차가운 200ℓℓ 10% 티씨에이 [trichloridic acid(TCA, Merck)]를 첨가하고 2분간 흔들어 준 후 5분간 4℃에서 반응시켰다.

,\_\_

5

10

15

25

위와 동일한 조건에서 원심 분리한 후 상층액을 제거하였으며 차가운 200ℓℓ의 70% 에탄올을 첨가한 후 4℃에서 5분간 방치하여 T 림프구를 고정하였다. 원심 분리한 후 상층액을 제거하였고, 상기의 방법과 동일한 조건으로 10% 티씨에이(TCA)를 처리하여 남아있는 <sup>3</sup>H-타이미딘 [thymidine (Amersham)]을 완전히 제거하였다.

여기에 100ሥ의 2% 에스디에스 [SDS(pH 8.0)]/0.5N 수산화나트륨(NaOH)을 첨가하고 37℃에서 30분간 반응시켜 세포 용해를 실시하였고, 25℃ 110×g 10분간 원심 분리하여 T 림프구를 침전시키고 상층액 중 50ሥ를 96구 샘플판(Wallac)으로 옮겼다. 상층액에 1.5배의 옵티페이스 슈퍼믹스 [OptiPhase SuperMix(Wallac)]를 넣어 5분간 흔들어 준 후 액체 흡광기 [1450 MicroBeta TriLux microplate liquid scintillation and luminescence counter(Wallac)]를 이용하여 <sup>3</sup>H에 대한 cpm값을 측정하여 T 림프구의 중식 여부를 확인하였다(도 6a).

도 6a에 나타낸 바와 같이 단순 융합된 이량체 단백질 [TNFR2/Fc]<sub>2</sub>, [CD2/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4/Fc]<sub>2</sub>, [LAG3/Fc]<sub>2</sub>은 모두 T 림프구의 증식을 억제하였으며, 이들 중에서도 [CTLA4/Fc]<sub>2</sub>와 [LAG3/Fc]<sub>2</sub>가 [TNFR2/Fc]<sub>2</sub>와 [CD2/Fc]<sub>2</sub>에 비하여보다 효과적으로 T 림프구의 증식을 억제하였다.

B. 단순 융합된 이량체의 복합 투여에 따른 T 림프구의 증식 억제 효과 확인

상기 실시예 5의 A와 동일한 절차에 따라 진행하되, 단순 융합된이량체 단백질 대신에 [CTLA4/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + [TNFR2/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + [CD2/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + [LAG3/Fc]<sub>2</sub>를 이용하여 T 림프구의 증식 억제 효과를확인하였다(도 6b).

도 6b에 나타낸 바와 같이 [CTLA4/Fc]2, [CTLA4/Fc]2 + [TNFR2/Fc]2,

[CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + [CD2/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + [LAG3/Fc]<sub>2</sub>가 모두 T 림프구의 증식을 억제함을 확인할 수 있었다. 또한, 단순 융합된 이량체 단백질을 복합 투여하는 경우가 단독 투여하는 경우 보다 T 림프구의 증식을 효과적으로 억제함을 확인할 수 있었다.

5

10

15

25

C. 연쇄 융합된 이량체 단백질의 단독 투여에 따른 T 림프구의 증식 억제 효과 확인

상기 실시예 5의 A와 동일한 절차에 따라 진행하되, 단순 융합된이량체 단백질 대신에 [TNFR2-TNFR2/Fc]<sub>2</sub>, [CD2-CD2/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4-CTLA4/Fc]<sub>2</sub>, [LAG3-LAG3/Fc]<sub>2</sub>를 이용하여 T 림프구의 증식 억제 효과를 확인하였다(도 6c).

도 6c에 나타낸 바와 같이 [TNFR2-TNFR2/Fc]<sub>2</sub>, [CD2-CD2/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4-CTLA4/Fc]<sub>2</sub>, [LAG3-LAG3/Fc]<sub>2</sub>가 모두 T 림프구의 증식을 억제함을 확인할 수 있었으며, 단순 융합된 이량체 단백질을 단독 투여할 때 보다는 연쇄 융합된 이량체 단백질을 단독 투여할 때에 T 림프구의 증식이 보다 효과적으로 억제됨을 확인할 수 있었다.

D. 연쇄 융합된 이량체 단백질의 복합 투여에 따른 T 림프구의 증식 억제 효과 확인

상기 실시예 5의 A와 동일한 절차에 따라 진행하되, 단순 융합된 20 이량체 단백질 대신에 [CTLA4/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4-CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + [TNFR2- TNFR2/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4-CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + [LAG3-LAG3/Fc]<sub>2</sub>를 이용하여 T 림프구의 중식 억제 효과를 확인하였다(도 6d).

도 6d에 나타낸 바와 같이 [CTLA4/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4-CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + [TNFR2-TNFR2/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4-CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + [CD2-CD2/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4-CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + [LAG3-LAG3/Fc]<sub>2</sub>가 모두 T 림프구의 증식을 억제함을 확인할 수 있었으며, 연쇄 융합된 이량체 단백질을 복합 투여한 경우가 단독 투여한 경우보다 T 림프구의

증식을 더욱 효과적으로 억제함을 확인할 수 있었다. 아울러, 이들 중에서도  $[CTLA4-CTLA4/Fc]_2$  +  $[LAG3-LAG3/Fc]_2$  가 T 림프구 증식 억제 효과가 가장 뛰어남을 확인할 수 있었다.

## 5 <실시예 6>

1

단순 융합된 이량체 단백질 또는 연쇄 융합된 이량체 단백질의 단독 또는 복합 처리에 따른 콜라겐 유도 관절염의 완화 효과 확인

A. 단순 융합된 이량체 단백질의 단독 처리에 따른 관절염 완화 효과 10 확인

아스로젠 씨아이에이 보조제(Arthrogen-CIA adjuvant, Chondrex, USA) 중의 0.05M의 아세트산에 2mg/ml의 농도로 녹인 타입 II 콜라겐을 DBA/1 생쥐한 마리당 꼬리에  $100\mu g$ 씩 주입하여 콜라겐 유도 관절염(CIA; Collagen Induced Arthritis)을 발병시켰다. 부스팅(Boosting)은 3주 후에 하였으며 불완전 프로인트 보조제(incomplete Freund's adjuvant, Difco, USA)를 이용하였다.

DBA/1 생쥐에 타입 Ⅱ 콜라겐 100μg으로 면역화시킨 후에 3-4 주 후에 관절염 증상이 나타났다. 증상이 나타난 후 3-5일이 지나면 생쥐의 발이 빨갛게 부어오르며, 염증성 관절염(inflammatory arthritis)은 3-4주 이상 지속되었으며, 염증이 약화되어도 관절은 영구히 경직되었다. 관절염 심도의 주관적 척도를 나타내는 표 3에 근거하여 1주일에 2-3회 측정하였다(각실험군에서 5마리 생쥐에서의 평균값을 구함).

15

20

<표 3> 관절염의 심도 스코어

심도스코어	병의 경과 상태
0	홍진과 종기가 없음
1	홍진과 작은 종기가 발목관절 또는 족근골에 한하여 나타난다
2	홍진과 작은 종기가 발목관절에서 족근골까지 번진다
3	홍진과 작은 종기가 발목관절에서 척골관절까지 번진다
4	홍진과 심한 종기가 발목관점, 다리, 발가락까지 확장된다

관철염에 걸린 생쥐에 단순 융합된 이량체 단백질 [TNFR2/Fc]<sub>2</sub>, [CD2/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4/Fc]<sub>2</sub> 또는 [LAG3/Fc]<sub>2</sub>를 각각 인산완충용액(PBS)에 200μg/0.5ml의 농도로 용해하여 복강내 투여하였다. CD2/Fc, TNFR2/Fc, CTLA4/Fc 그리고 LAG3/Fc를 실험군당 5마리의 생쥐에 19일 내지 45일동안 2일에 한번씩 10 μg을 주사하고 관절염 심도의 변화를 관찰하였다(도 7a).

10 도 7a에 나타낸 바와 같이 단순 융합된 이량체 단백질을 단독 투여한 경우가 대조군으로 인산완충용액을 주사한 생쥐에서 나타난 관절염 심도의 정도와 비교할 때 45일 기준으로 약 26~38% 감소된 효과를 보였다.

B. 단순 융합된 이량체 단백질의 복합 투여에 따른 관절염 완화 효과 15 확인

상기 실시예 6의 A와 동일한 절차에 따라 진행하되, 단순 융합된 이량체 단백질 대신에 [CTLA4/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + [TNFR2/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + [CD2/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + [LAG3/Fc]<sub>2</sub>를 이용하여 관절염 완화 효과를 확인하였다(도 7b).

20 도 7b에 나타낸 바와 같이 [CTLA4/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + [TNFR2/Fc]<sub>2</sub>,

[CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + [CD2/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + [LAG3/Fc]<sub>2</sub>가 관절염을 완화시키는 것을 확인할 수 있었으며, 단순 융합된 이량체 단백질을 복합 투여하는 경우가 단독 투여하는 경우보다 관절염을 완화시키는 효과가 뛰어남을 확인할 수 있었다.

;

5

10

15

25

C. 연쇄 융합된 이량체 단백질의 단독 투여에 따른 관절염 완화 효과 확인

상기 실시예 6의 A와 동일한 절차에 따라 진행하되, 단순 융합된 이량체 단백질 대신에 [TNFR2-TNFR2/Fc]<sub>2</sub>, [CD2-CD2/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4-CTLA4/Fc]<sub>2</sub>, [LAG3-LAG3/Fc]<sub>2</sub>를 이용하여 관절염 완화 효과를 확인하였다(도 7c).

도 7c에 나타낸 바와 같이 [TNFR2-TNFR2/Fc]<sub>2</sub>, [CD2-CD2/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4-CTLA4/Fc]<sub>2</sub>, [LAG3-LAG3/Fc]<sub>2</sub>가 관절염을 완화시키는 것을 확인할 수 있었다. 이 때, 단순 융합된 이량체 단백질을 단독 투여한 경우보다 우수하고 단순 융합된 이량체 단백질을 복합 투여한 경우와 비슷한 정도의 관절염 완화효과를 발휘하였다.

D. 연쇄 융합된 이량체 단백질의 복합 투여에 따른 관절염 완화 효과확인

상기 실시예 6의 A와 동일한 절차에 따라 진행하되, 단순 융합된 20 이량체 단백질 대신에 [CTLA4/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4-CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + [TNFR2- TNFR2/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4-CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + [LAG3-LAG3/Fc]<sub>2</sub>를 이용하여 관절염 완화 효과를 확인하였다(도 7d).

도 7d에 나타낸 바와 같이 [CTLA4/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4-CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + [TNFR2-TNFR2/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4-CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + [CD2-CD2/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4-CTLA4/Fc]<sub>2</sub> + [LAG3-LAG3/Fc]<sub>2</sub>가 관절염을 완화시키는 것을 확인할 수 있었으며 특히, 연쇄 융합된이량체 단백질을 복합 투여하는 경우가 단독 투여하는 경우 보다 관절염 완화

효과가 우수함을 확인할 수 있었다.

<실시예 7>

10

15

단순 융합된 이량체 단백질 또는 연쇄 융합된 이량체 단백질의 단독 5 또는 복합 처리에 따른 이식편대 숙주질환 치료 효과 확인

A. 단순 융합된 이량체 단백질의 이식편대 숙주질환 치료효과

본 발명에서 사용한 마우스는 몸무게 20~25g의 8~12주령 암컷 마우스 C57BL/6과 BDF1[(C57BL/6 x DBA/2)F<sub>1</sub>]이며, 멸균된 사육장(filter-top microisolator)에서 사육하였다. 수령 마우스에게는 공여 마우스의 비장 세포를 주입하기 하루 전에 박트림(bactrim)을 투여하였다. BDF1 (H-2Kb/d) 수령 마우스는 연세대학교의 미생물학 교실로부터 전신에 700cGy의 감마선을 조사(irradiation)받은 것을 이용하였다. 공여 마우스로부터 수득한 비장 세포는 10% 알피엠아이(RPMI)에 1%의 페니실린/스트렙토마이신을 첨가한 배지에 준비하였고, 세포는 400g에서 10분간 원심분리하여 수득하였다.

이식편대 숙주질환을 유발하기 위하여 앞서 감마선에 의해 조사된 BDF1 수령 마우스에게 동종 공여 마우스인 C57BL/6 마우스(H-2Kb)의 살아있는 비장 세포(25 x 10<sup>6</sup>개)를 역방향 주입 방법을 이용하여 이식하였다.

상기 이식편대 숙주질환에 걸린 수령 마우스에게 단순 융합된 이량체 단백질인 [CD2/Fc]<sub>2</sub>, [LAG3/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4/Fc]<sub>2</sub> 각각을 인산완충용액(PBS)에 200 $\mu$ g/0.5 $\mu$ g의 농도로 용해하여 0, 2, 4, 6일째에 복강내 투여하였다. 여기서, 대조군 수령 마우스에게는 PBS를 투여하였으며, 상기 수령 마우스들의 생존율을 비교하기 위해서 격일로 몸무게를 측정하여 생존율을 계산하였다(도 8a).

25 도 8a에 나타낸 바와 같이 대조군 수령 마우스의 경우 이식편대 숙주질환으로 인하여 체중이 빠르게 감소하였고, 공여 마우스의 활성화된 T 림프구의 증식으로 인하여 수령 마우스의 비장 세포 수가 감소하였다. 결국은 비장 세포를 수령 마우스로 이식한지 2주 정도 경과한 후에 본 발명에 사용된모든 대조군 마우스가 심각한 체중 감소를 나타냈으며, 사망에이르렀다. 한편, 단순 융합된 이량체 단백질인 [CD2/Fc]2, [LAG3/Fc]2, [CTLA4/Fc]2를 각각 단독 투여받은 마우스의 경우에는 모두 이식편대숙주질환에 의한 치사율이 대조군에 비하여 감소하였다. 상기와 같이 단순융합된 이량체 단백질을 단독 투여한 경우에 [LAG3/Fc]2가 약 4주의 생존기간을 보여서 가장 좋은 면역억제 효과를 나타내었으며, [CTLA4/Fc]2, [CD2/Fc]2의 순서로 생존율이 증가하는 결과를 보여주었다.

10

15

5

B. 단순 융합된 이량체 단백질의 단독 및 복합 투여에 따른 이식편대 숙주질환 치료효과

이식편대 숙주질환에 걸린 수령 마우스에 단순 융합된 이량체 단백질  $[CD2/Fc]_2$ .  $[LAG3/Fc]_2$ , [CTLA4/Fc]<sub>2</sub> 각각을 인산완충용액(PBS)에 200µg/0.5ml의 농도로 용해하여 0, 2, 4, 6일째에 복강내 투여하였다. 마찬가지로, 이식편대 숙주질환에 걸린 또 다른 수령 마우스에 단순 융합된 이량체 단백질의 혼합물 [CD2/Fc]<sub>2</sub> + [CTLA4/Fc]<sub>2</sub> 또는 [LAG3/Fc]<sub>2</sub> + [CTLA4/Fc]2를 각각 인산완충용액(PBS)에 200µg/0.5㎖의 농도로 용해하여 0, 2, 4, 6일째에 복강내 투여하였다(도 8b).

도 8b에 나타낸 바와 같이 실시예 7의 A에 따른 결과와 비교했을 때단순 융합된 이량체 단백질을 단독으로 투여한 경우보다는 복합적으로 투여한 경우에 더 높은 생존율이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 그 중에서도 특히 [LAG3/Fc]<sub>2</sub> + [CTLA4/Fc]<sub>2</sub> 혼합물을 투여한 경우에 개체 전원이 약 40일 이상의 생존기간을 나타냄으로써 이식편대 숙주질환에 의한 치사율을 가장 많이 감소시킴을 보여주었다. 이 결과를 각각 10마리의 마우스에서 평균생존기간을 계산하여 도표화하였으며(표 4), 이러한 결과는 이식편대

숙주질환의 치료에는 단순 융합 이량체 단백질을 1종 단독으로 사용하는 것보다는 2종 이상 복합적으로 투여하는 것이 더 좋은 치료효과를 달성함 수 있음을 보여주는 것이다.

#### 5 < 3 4>

단순 융합된 이량체 단백질의 단독 및 복합 투여에 의한 이식편대 숙주질환 치료효과 비교

면역억제제	공여 마우스	수령 마우스	마리수	생존일수	평균생존일수
(mg/kg/일)	0 9 975				± SEM
PBS	C57BL/6	BDF1	10	11~15	13.7±1.06
[CD2/Fc] <sub>2</sub>	C57BL/6	BDF1	10	14~22	15.7±3.37
[LAG3/Fc] <sub>2</sub>	C57BL/6	BDF1	10	13~26	18±5.12
[CTLA4/Fc] <sub>2</sub>	C57BL/6	BDF1	10	19~28	23.2±3.49
[CD2/Fc] <sub>2</sub>	C57BL/6	DDD-1	10	16~29	00.01.
+ [CTLA4/Fc] <sub>2</sub>	CO7BL/6	BDF1			23.2±5.71
[LAG3/Fc] <sub>2</sub>	C57DI /C	BDF1	10	21~40	28±7.71
+ [CTLA4/Fc] <sub>2</sub>	C57BL/6				

10 C. 단순 융합된 이량체 단백질 및 연쇄 융합된 이량체 단백질에 의한 이식편대 숙주질환 치료효과 비교

#### (1) CTLA-4의 경우

이식편대 숙주질환에 걸린 수령 마우스에 단순 융합된 이량체 단백질인 15 [CTLA4/Fc]<sub>2</sub>을 인산완충용액(PBS)에 200μg/0.5ml의 농도로 용해하여 0, 2, 4, 6일째에 복강내 투여하였다. 마찬가지로, 이식편대 숙주질환에 걸린 또 다른 수령 마우스에 연쇄 융합된 이량체 단백질인 [CTLA4-CTLA4/Fc]<sub>2</sub>를 인산완충용액(PBS)에 200μg/0.5ml의 농도로 용해하여 0, 2, 4, 6일째에 복강내 투여하였다(도 8c).

도 8c에 나타낸 바와 같이 이식편대 숙주질환에 걸린 수령 마우스에게 [CTLA4/Fc]2를 단독 투여한 경우에 약 26일의 최대 생존 기간을 보인 반면에, [CTLA4-CTLA4/Fc]2를 단독 투여한 경우에 약 38일의 최대 생존 기간을 보였다. 이 결과를 각각 10마리의 마우스에서 평균생존기간을 계산하여 도표화하였다(표 5). 이러한 결과들은 단순 융합된 이량체 단백질보다는 연쇄 융합된 이량체 단백질이 이식편대 숙주질환에 더 좋은 효과를 가지고 있음을 보여주는 것이다.

<丑 5>

5

10

단순 융합된 이량체 단백질 및 연쇄 융합된 이량체 단백질에 의한 이식편대 숙주질환 치료효과 비교

면역 억제제	고여 마으스	수령 마우스	마리수	생존일수	평균생존일수
(mg/kg/일)	54 47C				± SEM
PBS	C57BL/6	BDF1	10	11~15	13.7±1.06
[CTLA4/Fc] <sub>2</sub>	C57BL/6	BDF1	10	14~26	18.4±4.70
[CTLA4-CTLA4/Fc] <sub>2</sub>	C57BL/6	BDF1	10	19~38	28.2±8.12

15

20

#### (2) TNFR2의 경우

이식편대 숙주질환에 걸린 수령 마우스에 단순 융합된 이량체 단백질인 [TNFR2/Fc]<sub>2</sub>를 인산완충용액(PBS)에 200µg/0.5ml의 농도로 용해하여 0, 2, 4, 6일째에 복강내 투여하였다. 마찬가지로, 이식편대 숙주질환에 걸린 또 다른 수령 마우스에 연쇄 융합된 이량체 단백질인 [TNFR2-TNFR2/Fc]<sub>2</sub>를 인산완충용액(PBS)에 200µg/0.5ml의 농도로 용해하여 0, 2, 4, 6일째에 복강내

투여하였다(도 8d).

5

15

20

25

도 8d에 나타낸 바와 같이 이식편대 숙주질환에 걸린 수령 마우스에게 [TNFR2/Fc]<sub>2</sub>를 단독 투여한 경우에 약 20일의 최대 생존 기간을 보인 반면에, [TNFR2-TNFR2/Fc]<sub>2</sub>를 단독 투여한 경우에 약 35일의 최대 생존 기간을 보였다. 이러한 결과들은 단순 융합된 이량체 단백질보다는 연쇄 융합된 이량체 단백질이 이식편대 숙주질환에 더 좋은 효과를 가지고 있음을 보여주는 것이다.

D. [TNFR2-TNFR2/Fc]<sub>2</sub>의 [TNFR2-TNFR2/Fc]<sub>2</sub>에 10 의한 이식편대 숙주질환 치료효과 비교

이식편대 숙주질환에 걸린 수령 마우스에 단순 융합된 이량체 단백질인 [TNFR2/Fc]<sub>2</sub>를 인산완충용액(PBS)에 200μg/0.5ml의 농도로 용해하여 0, 2, 4, 6일째에 복강내 투여하였다. 마찬가지로, 이식편대 숙주질환에 걸린 또 다른 수령 마우스에 연쇄 융합된 이량체 단백질인 [TNFR2-TNFR2/Fc]<sub>2</sub> 또는 [TNFR2-TNFR1/Fc]<sub>2</sub>를 인산완충용액(PBS)에 200μg/0.5ml의 농도로 용해하여 0, 2, 4, 6일째에 복강내 투여하였다(도 8e).

도 8e에 나타낸 바와 같이 이식편대 숙주질환에 걸린 수령 마우스에게 [TNFR2/Fc]2를 단독 투여한 경우에 약 20일의 최대 생존 기간을 보인 반면에, [TNFR2-TNFR1/Fc]2를 단독 투여한 경우에 약 30일의 최대 생존 기간을 보였으며, [TNFR2-TNFR2/Fc]2를 단독 투여한 경우에는 약 35일의 최대 생존 기간을 보였으며, [TNFR2-TNFR2/Fc]2를 단독 투여한 경우에는 약 35일의 최대 생존 기간을 보였다. 이러한 결과들은 단순 융합된 이량체 단백질보다는 연쇄 융합된 이량체 단백질이 이식편대 숙주질환에 더 좋은 효과를 가지고 있음을 보여주는 것이다. 또한, [TNFR2-TNFR1/Fc]2와 [TNFR2-TNFR2/Fc]2는 효과면에서 거의 유사하였지만, [TNFR2-TNFR2/Fc]2가 보다 우수한 면역억제효과를 보유하고 있음을 확인하였다.

E. 연쇄 융합된 이량체 단백질의 단독 또는 복합 투여에 따른 이식편대 숙주질환 치료효과

이식편대 숙주질환에 걸린 수령 마우스에 연쇄 융합된 이량체 단백질인 [CD2-CD2/Fc]<sub>2</sub>, [LAG3-LAG3/Fc]<sub>2</sub>, [CTLA4-CTLA4/Fc]<sub>2</sub>, [TNFR2-TNFR1/Fc]<sub>2</sub>를 각각 인산완충용액(PBS)에 200 $\mu$ g/0.5 $\mu$ l의 농도로 용해하여 0, 2, 4, 6일째에 복강내 투여하였다. 마찬가지로, 이식편대 숙주질환에 걸린 또 다른 수령 마우스에 연쇄 융합된 이량체 단백질의 복합체인 [CD2-CD2/Fc]<sub>2</sub> + [CTLA4-CTLA4/Fc]<sub>2</sub>를 각각 인산완충용액(PBS)에 200 $\mu$ g/0.5 $\mu$ l의 농도로 용해하여 0, 2, 4, 6일째에 복강내 투여하였다(도 8f).

도 8f에 나타낸 바와 같이 대조군 마우스의 경우 상기 결과와 유사하게 약 2주 후에는 100% 치사율을 나타내었다(표 6). 실시예 7의 B에 따른 단순 융합된 이량체 단백질의 경우와 유사하게, 연쇄 융합된 이량체 단백질의 단독투여보다는 복합 투여가 보다 좋은 생존율을 나타냄을 알 수 있었다. 연쇄 융합된 이량체 단백질을 복합 투여한 [CD2-CD2/Fc]2 + [CTLA4-CTLA4/Fc]2와 [LAG3-LAG3/Fc]2+[CTLA4-CTLA4/Fc]2의 경우에 비장세포 주입 후 약 10주까지도 각각 40%와 50%의 생존율을 나타내었다. 이러한 결과들은 이식편대 숙주질환의 치료를 위하여 연쇄 융합된 단백질을 복합적으로 투여하는 것이 더욱 좋은 치료 효과를 달성할 수 있음을 시사하는 것이다.

5

10

15

<표 6> 연쇄 융합된 이량체 단백질의 단독 또는 복합 투여에 따른 이식편대 숙주질환 치료효과 비교

면역억제제	공여마우스	수령마우스	마리수	川 3 01 人	평균생존일수
(mg/kg/day)	0 1 1 1 -			생존일수	± SEM
PBS	C57BL/6	BDF1	10	11~15	13.7±4.3
[CD2-CD2/Fc] <sub>2</sub>	C57BL/6	BDF1	10	19~28	21.4±5.6
[TNFR2-TNFR2/Fc] <sub>2</sub>	C57BL/6	BDF1	10	20~34	26.2±6.1
[TNFR2-TNFR1/Fc] <sub>2</sub>	C57BL/6	BDF1	10	18~31	23.6±5.4
[CTLA4-CTLA4/Fc] <sub>2</sub>	C57BL/6	BDF1	10	19~38	28.2±8.2
[LAG3-LAG3/Fc] <sub>2</sub>	C57BL/6	BDF1	10	22~50	34.6±10.6
[CD2-CD2/Fc] <sub>2</sub> +	C57BL/6	DDE 1	10	44-21-21	
[CTLA4-CTLA4/Fc] <sub>2</sub>	C37BL/6	BDF1	10	44이상	100이상
[LAG3-LAG3/Fc] <sub>2</sub> +	C57DI /C	BDF1	10	50이상	
[CTLA4-CTLA4/Fc] <sub>2</sub>	C57BL/6				100이상

5

10

본 발명에 따른 Ig 융합 단백질은 모두 T 림프구의 활성화를 억제함을 확인할 수 있었다. 특히, 단순 융합된 이량체 단백질 보다는 연쇄 융합된이량체 단백질의 억제 효과가 보다 우수하였다. 또한, 단순 융합된 이량체단백질 및 연쇄 융합된 이량체 단백질은 단독 투여 보다는 복합 투여하는경우에 T 림프구의 활성화를 효과적으로 억제할 수 있음을 확인할 수 있었다.

기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 재료의 표시사항

A. 하기의 표시사항은 명세서 <u>29</u> 쪽 <u>5-</u>	15줄에 기재된 기탁 미생물 또는 기타 생물학				
재료에 관한 것임.					
B. 기탁물의 특징 이외의 추가적 기탁물은 다음 별도의 페이지에 기재□					
기탁기관					
한국미생물 보존센터(KCCM)					
기탁기관의 주소지(우편번호 및 국명 기	기재)				
한국미생물 보존센터(KCCM)					
(120-091) 대한민국 서울시 서대문-	구 호계도 261 221 오린베디				
(120 051) 대한민국 기술의 기대한	1 중세층 301-221 파념결팅				
·					
기탁날짜 2004. 01.13	기탁번호 KCCM-10556				
C. 추가적 표시 사항(기재사항이 없으면	! 공란으로 제출)				
	별도의 다음 페이지에 계속□				
D. 표시사항이 지정하고 있는 특징적 시	h항·				
	•				
E. 별도의 보충적 표시시항(기재사항이 없으면 공란으로 제출)					
하기의 별도 표시사항은 후에 국제사무국에 제출될 것임					
(표시사항의 일반적 성질을 특정할 것)					
(22.116.1					
스키 한 기 기 기 기					
수리관청 기재란	국제사무관 기재란				
□ 국체출원과 함께 수리되었음	□ 국제사무국에 의하여 수리되었음				
-1 -1 -1					
담당관	담당관				

### <u>특허청구범위</u>

5

- 1. MHC Class II 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질, 공조자극 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질, 부착 분자와이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질 및 사이토카인과 이의 수용체의결합을 차단할 수 있는 물질로 이루어진 그룹으로부터 2종 이상 선택된 물질을활성 성분으로 포함하여 T 림프구의 활성화를 억제하는 면역질환 치료용약제학적 조성물.
- 2. 제 1항에 있어서, 상기 MHC Class II 분자와 CD4의 결합을 차단할 수 있는 물질은 (1) MHC Class II 분자에 대한 항체, (2) 면역글로불린 Fc 단편의 힌지 부위에 LAG3의 세포외역 가용성 부위가 결합하여 형성된 단순 융합된 단량체 단백질, (3) 상기 단순 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 결합된 단순 융합된 이량체 단백질, (4) 상기 단순 융합된 단량체 단백질에서 힌지 부위에 결합된 LAG3의 세포외역 가용성 부위의 N-말단에 또 다른 LAG3의 세포외역 가용성 부위의 C-말단이 결합하여 형성된 연쇄 융합된 단량체 단백질, (5) 상기 연쇄 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 연결된 연쇄 융합된 이량체 단백질 및 (6) 상기 (2) 내지 (5)에 따른 단백질의 당쇄화된 단백질로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 면역질환 치료용약제학적 조성물.
- 3. 제 1항에 있어서, 상기 공조자극 분자는 B7, CD154, CD70, OX40L, ICOS-L, 4-1BBL, HVEM, FASL, PDL이고, 이들의 수용체는 각각 CD28과 CTLA-4, CD40, CD27, OX40, ICOS, 4-1BB, LIGHT, FAS, PD-1인 것을 특징으로 하는 면역질환 치료용 약제학적 조성물.

4. 제 3 항에 있어서, 상기 B7 분자와 CD28 의 결합을 차단할 수 있는 물질은 (1) B7 에 대한 항체, (2) 면역글로불린 Fc 단편의 힌지 부위에 CTLA4 의 세포외역 가용성 부위가 결합하여 형성된 단순 융합된 단량체 단백질, (3) 상기 단순 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 결합된 단순 융합된 이량체 단백질, (4) 상기 단순 융합된 단량체 단백질에서 힌지 부위에 결합된 CTLA4 의 세포외역 가용성 부위의 N-말단에 또다른 CTLA4 의 세포외역 가용성 부위의 C-말단이 결합하여 형성된 연쇄 융합된 단량체 단백질, (5) 상기 연쇄 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 연결된 연쇄 융합된 이량체 단백질 및 (6) 상기 (2) 내지 (5)에 따른 단백질의 당쇄화된 단백질로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 면역질환 치료용 약제학적 조성물.

\_\_\_

5

10

- 5. 제 1항에 있어서, 상기 부착 분자는 LFA-3, ICAM-1, VCAM-1이고, 이들의 수용체는 각각 CD2, LFA-1, VLA-4인 것을 특징으로 하는 면역질환 15 치료용 약제학적 조성물.
- 6. 제 5 항에 있어서, 상기 LFA-3 와 CD2 의 결합을 차단할 수 있는 물질은 (1) LFA-3 에 대한 항체, (2) 면역글로불린 Fc 단편의 힌지 부위에 CD2 의 세포외역 가용성 부위가 결합하여 형성된 단순 융합된 단량체 단백질, (3) 상기 단순 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 결합된 단순 융합된 이량체 단백질, (4) 상기 단순 융합된 단량체 단백질에서 힌지 부위에 결합된 CD2 의 세포외역 가용성 부위의 N-말단에 또다른 CD2 의 세포외역 가용성 부위의 C-말단이 결합하여 형성된 연쇄 융합된 단량체 단백질, (5) 상기 연쇄 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 CJ 디설파이드 결합에 의해 연결된 연쇄 융합된 이량체 단백질 및 (6) 상기 (2)

내지 (5)에 따른 단백질의 당쇄화된 단백질로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 면역질환 치료용 약제학적 조성물.

:-

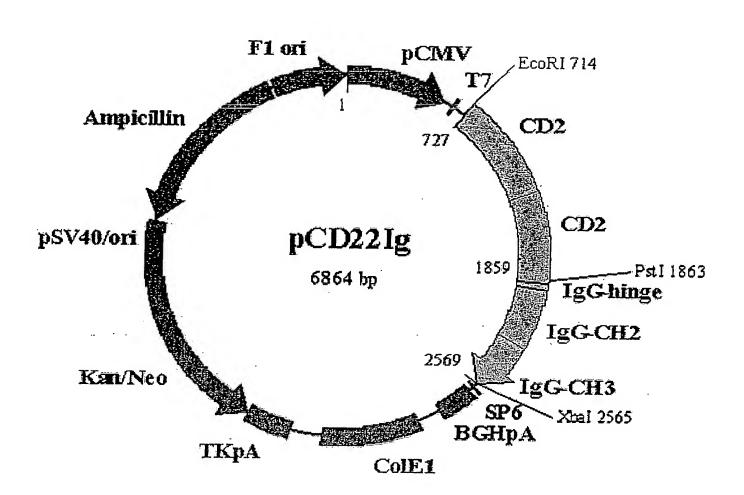
- 7. 제 1항에 있어서, 상기 사이토카인은 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, TNF, TGF, IFN, GM-CSF, G-CSF, EPO, TPO, M-CSF이고 이의 수용체는 IL-1R, IL-2R, IL-3R, IL-4R, IL-5R, IL-6R, IL-7R, TNFR, TGFR, IFNR, 인터페론-α R, -β R 및 -γ R, GM-CSFR, G-CSFR, EPOR, cMp1, gp130인 것을 특징으로 하는 면역질환 치료용 약제학적 조성물.
- 10 8. 제 7 항에 있어서, TNF와 TNFR의 결합을 차단할 수 있는 물질은 (1) TNF에 대한 항체, (2) 면역글로불린 Fc 단편의 힌지 부위에 TNFR의 세포외역가용성 부위가 결합하여 형성된 단순 융합된 단량체 단백질, (3) 상기 단순융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 결합된단순 융합된 이량체 단백질, (4) 상기 단순 융합된 단량체 단백질에서 힌지 부위에 결합된 TNFR의 세포외역 가용성 부위의 C-말단이 결합하여 형성된 연쇄 융합된 단량체 단백질, (5) 상기 연쇄 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드결합에 의해 연결된 연쇄 융합된 이량체 단백질 및 (6) 상기 (2) 내지 (5)에따른 단백질의 당쇄화된 단백질로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 면역질환 치료용 약제학적 조성물.
  - 9. 제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역질환은 자가면역 질환 또는 장기이식 합병증인 것을 특징으로 하는 면역질환 치료용약제학적 조성물.

10. 제 9 항에 있어서, 상기 자가면역 질환은 류마티스 관절염, 다발성경화증, 중증 근무력증, 그레브스병, 하시모토씨 갑상선염, 애디슨병, 백반증, 경피증, 굿패스쳐 신드롬, 베제트병, 크론병, 강직성 척추염, 포도막염, 혈소판 감소성 자반증, 심상성 천포창, 소아 당뇨병, 자가면역성 용혈성 빈혈, 크라일로글로불린증, 부신백질이영양증 및 전신성 홍반성 낭창으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 면역질환 치료용 약제학적 조성물.

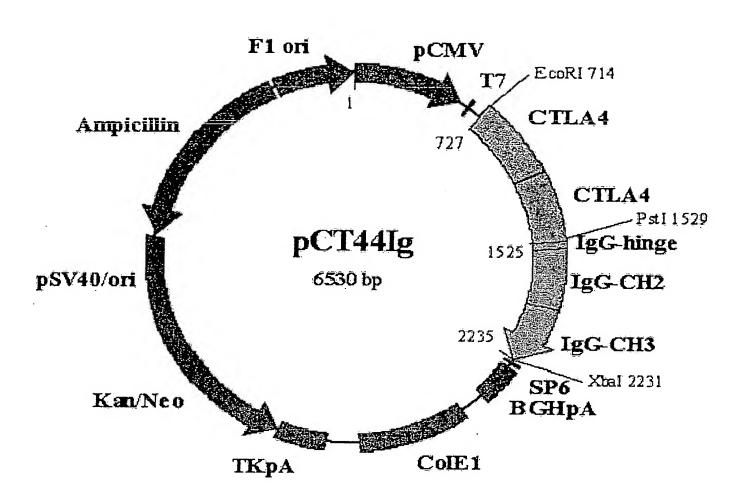
## <u>요약서</u>

본 발명은 MHC(Major Histocompatibility Complex) Class II 분자와이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질, 공조자극 분자와 이의 수용체의결합을 차단할 수 있는 물질, 부착 분자와 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질 및 사이토카인과 이의 수용체의 결합을 차단할 수 있는 물질로이루어진 그룹으로부터 2종 이상 선택된 물질을 활성 성분으로 포함하여 T 림프구의 활성화를 억제하는 면역질환 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

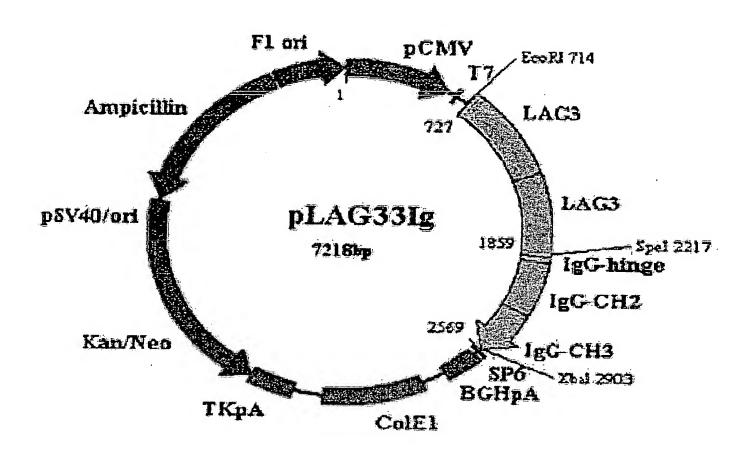
1/20 . FIG. 1

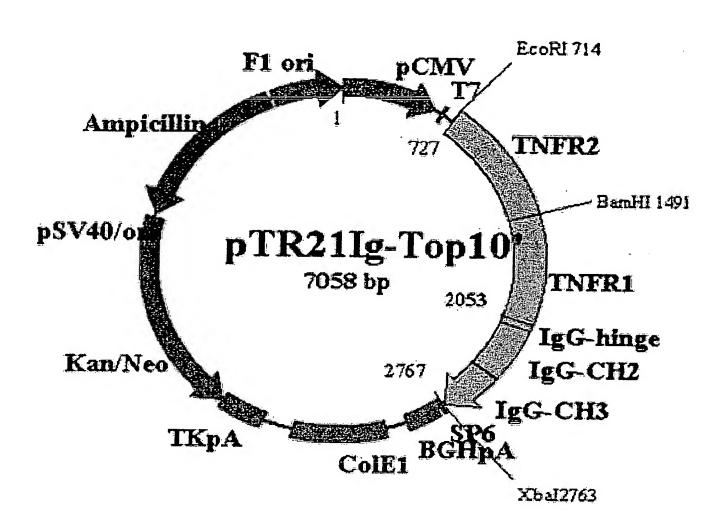


2/20 FIG. 2

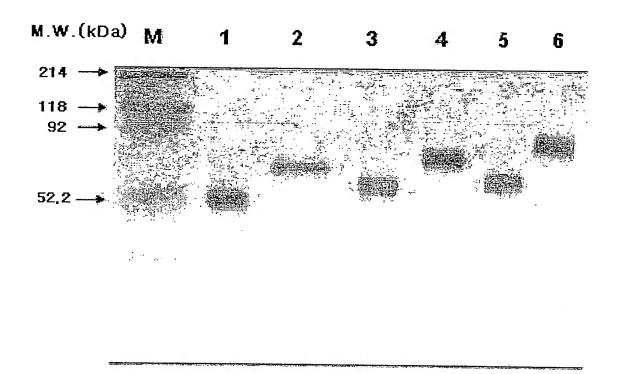


3/20 FIG. 3

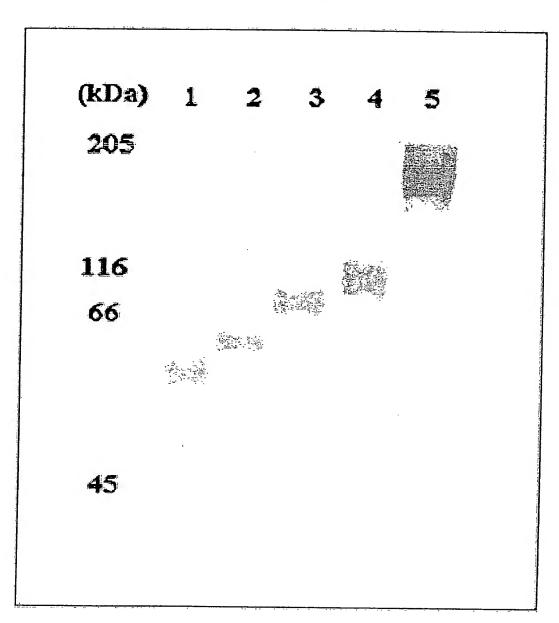




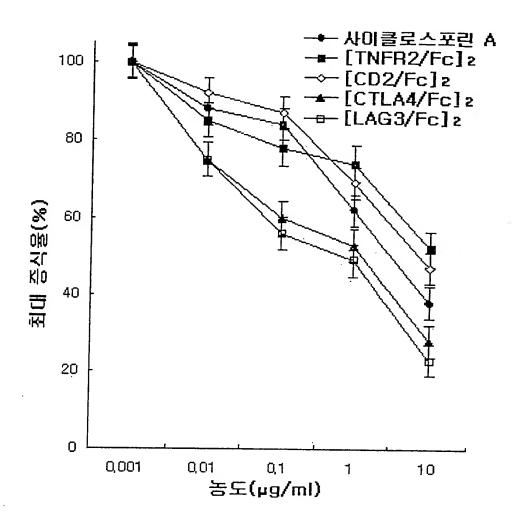
5/20 FIG. 5a



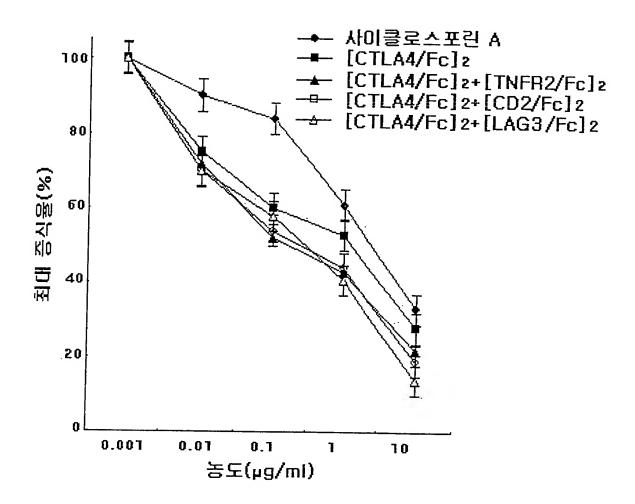
6/20 FIG. 5b



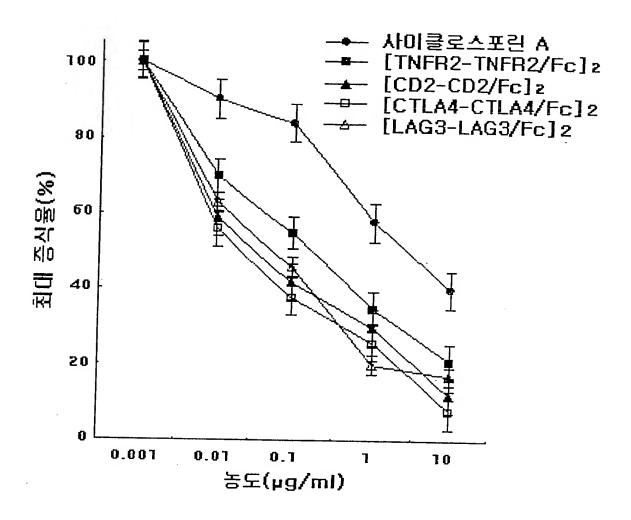
7/20 FIG. 6a



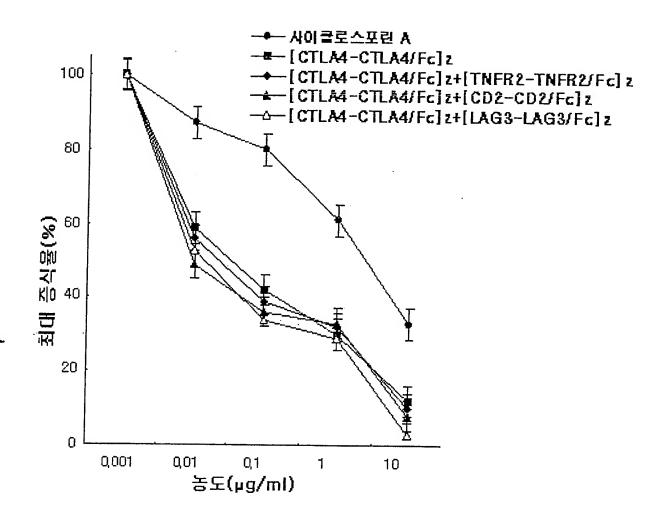
8/20 FIG. 6b



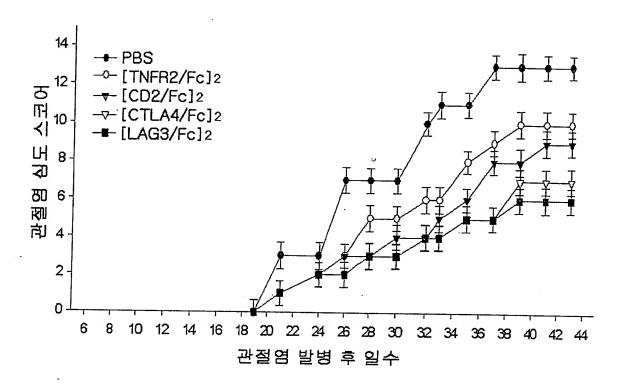
9/20 FIG. 6c



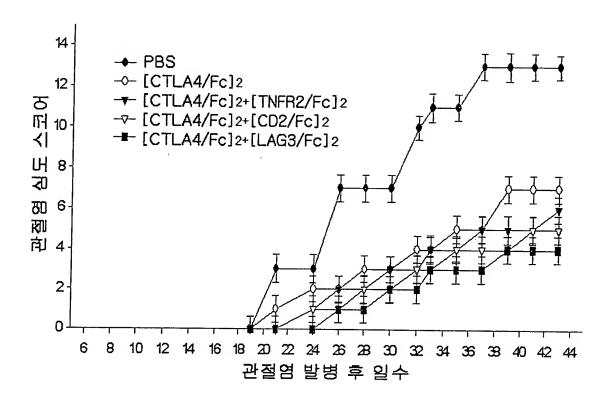
10/20 FIG. 6d



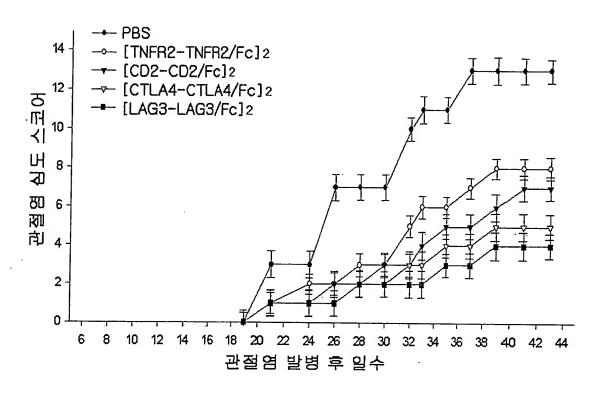
11/20 FIG. 7a



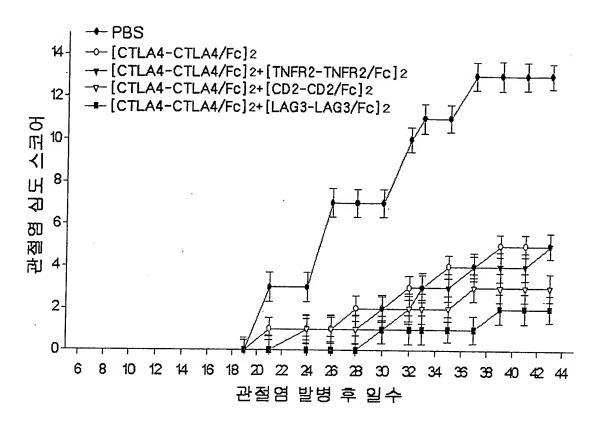
12/20 FIG. 7b



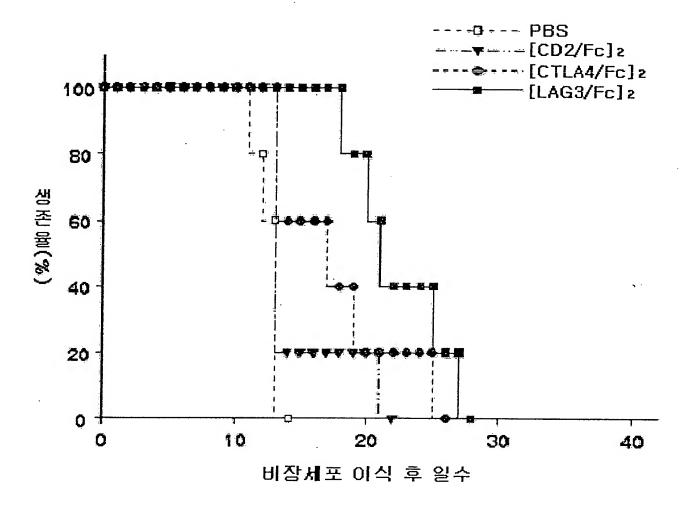
13/20 FIG. 7c



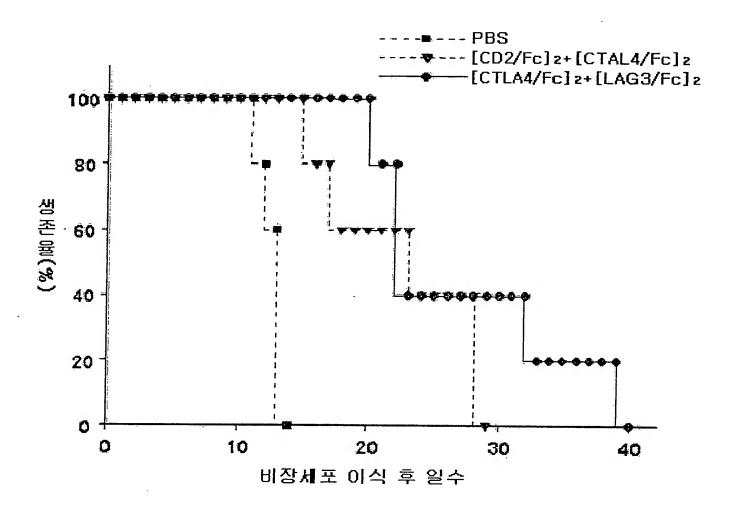
14/20 FIG. 7d



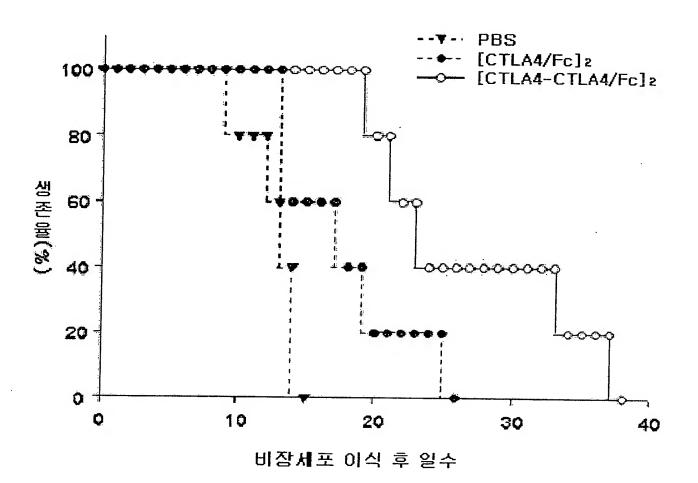
15/20 FIG. 8a



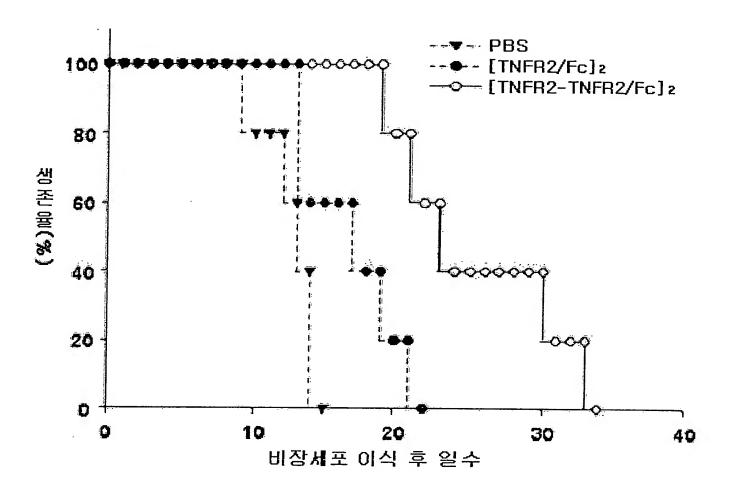
16/20 FIG. 8b



17/20 FIG. 8c



18/20 FIG. 8d



19/20 FIG. 8e

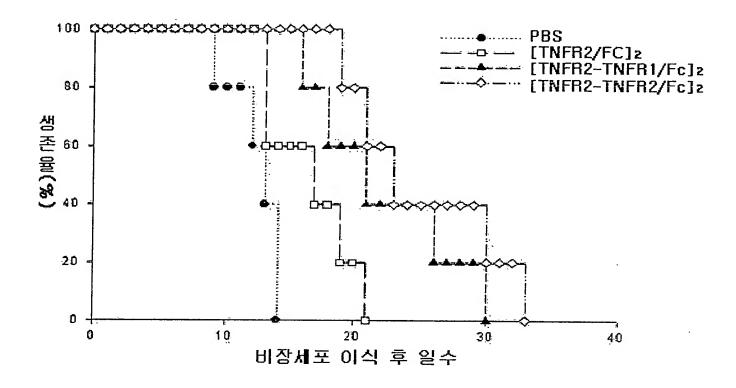
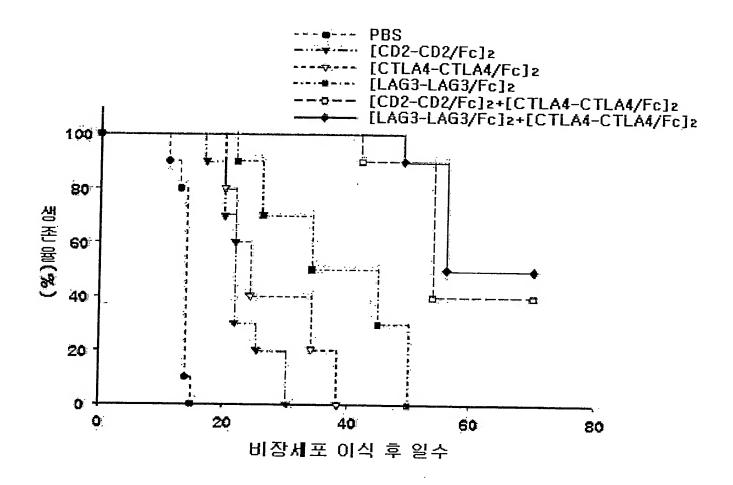


FIG. 8f



# Sequence Listing

<110>	MEDEXGEN INC CHUNG, Yong Hoon CHO, Hoon Sik PARK, Hong Gyu YI, Ki Wan	
<120>	PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATMENT OF IMMUNOLOGICAL DISORDERS	
<130>	P052MED02PCT	
<150>	KR10-2004-0010835	
	2004-02-18	
<160>	26	
<170>	KopatentIn 1.71	
<210>	1	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer, oligo-LAG3-F-EcoRI	
<400>	1	
	atg tgggaggctc agttcctggg c	
ggaacte	atg tgggaggete agtteetggg e	31
	·	
<210>	2	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
	~	
<220>		
<223>	primer, oligo-LAG3-R-5P	

<400>	2	
agtgag	gtta tacatgatgg agacgttg	28
<210>	3	
<211>	21	
<212>	AND	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer, oligo-LAG3-F-5P	
<400>		
ctccago	cag gggctgaggt c	21
<210>	4	
<211>	30 .	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primor olice IAC2 p.cr	
~2237	primer, oligo-LAG3-R-SpeI	
<400>	4	
gactagtt	gg gggctccaga cccagaacag	30
		30
	,	
(210>	5	
211>	28	
212>	DNA	
213>	Artificial Sequence	
220>		
223>	primer, hIgG-F-SpeI	
400>	5	

gagtag	tgca gag	ccca	aat	cttg	tgac	:									28
<210>	6														
<211>	34														
<212>	DNA														
<213>	Artif	icia	l Se	quen	ce										
<220>															
<223>	prime	r, h	IgG-	R-Xb	aI										
														·	
<400>	6														
gctctag	agc tca	ttta	ccc (	ggaga	acag	gg a	gag								34
<210>	7														
<211>	1503														
<212>	DNA														
<213>	Homo s	sapie	ens												
<220>	,											_			
<221>	sig_pe	ptic	le									-			
<222>	(1)	(66)													
<220>															
<221>	CDS														
<222>	(1)(	1500													
<223>	LAG3/F		•												
<400>	7														
atg tgg															48
Met Trp	GIU AIA	5	Pne	Leu	GTÀ	ьeu		Pne	ьeu	GIn	Pro		Trp		
<u></u>		3					10			•		15			
gtg gct	cca gtg	aag	cct	ctc	cag	cca	ggg	gct	gag	gtc	cca	gta	ata		96
/al Ala															
	20					25					30				

tg	ggc	ca	g ga	g ggg	g gci	t cct	gc	c caq	g cto	c cc	c tg	c ag	c cc	c ac	a atc	:	144
Trp	Ala	Gl	n Gl	u Gly	/ Ala	a Pro	Ala	a Gli	າ Leເ	ı Pro	о Су	s Se	r Pr	o Th	r Ile	:	
		3	5				4 (	)				4	5				
ccc	cto	ca	a dat	ctc	: ago	c ctt	cto	a cas		a ac	3 00	a atı	ר פרי	t ta	g cag		192
															o Gln		192
	50		•			55			,	,	60			,	9 0111		
cat	cag	cca	a gad	agt	ggc	ccg	ccc	gct	gcc	gc	ccc	ggd	cat	t cc	ctg		240
His	Gln	Pro	Asp	Ser	Gly	, Pro	Pro	Ala	Ala	Ala	Pro	Gly	y His	s Pro	Leu		
65					70	)				75	5				80		
acc	ccc	aac	cct	cac	cca	aca	aca		tcc	+ + c c	. tac				g ccc		200
															Pro		288
		-		85					90			. 017		95			
cgc	cgc	tac	acg	gtg	ctg	agc	gtg	ggt	ccc	gga	ggc	ctg	cgc	ago	ggg		336
Arg	Arg	Tyr	Thr	Val	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gly	Gly	Leu	Arg	Ser	Gly		
			100					105					110				
agg	cta	ccc	cta	cac	ccc	cac	at c	~~~	c+ ~	~ > +	~~~				cag		20.4
															Gln		384
_		115				9	120	02	200		014	125	Gly	ALG	GIII		
cgc	ggg	gac	ttc	tcg	cta	tgg	ctg	cgc	сса	gcc	cgg	cgc	gcg	gac	gcc		432
Arg	Gly	Asp	Phe	Ser	Leu	Trp	Leu	Arg	Pro	Ala	Arg	Arg	Ala	Asp	Ala		
	130					135					140						
aac	~ ~ ~	t 2.0	555		~~~	~+~											
						gtg Val											480
145		- ,	9		150			202	n. g	155	Arg	VIG	ъец	261	160		
															100		
cgc	ctc	cgt	ctg	cgc	ctg	ggc	cag	gcc	tcg	atg	act	gcc	agc	ccc	сса		528
Arg	Leu	Arg	Leu	Arg	Leu	Gly	Gln	Ala	Ser	Met	Thr	Ala	Ser	Pro	Pro		
				165					170					175			
																	,
						gac									_		576
эху .	JEI .		Arg 180	KT G	ser .	Asp '		vai 185	тте	ьeи	Asn			Phe	Ser		
			100					103					190				

cgo	cct	ga	c cg	c cca	a gc	tct	gt	g car	t tg	tto	cgg	g aa	c cg	g gg	c cag		624
Arg	, Pro	As	p Are	g Pro	o Ala	s Ser	Va.	l His	s Trp	Phe	e Arç	) Ası	n Ar	g G1	y Gln	ı	
		19	5				200	)				20	5				
															a agc		672
Gly			l Pro	o Val	Arç			Pro	His	His			ı Ala	Gli	u Ser		
	210	)				215					220	)					
tto	cto	: ††	cto	י כככ	caa	atc	200		· a+o	( (2)	tct			. + a	g ggc		700
															g ggc o Gly		720
225					230					235		<u> </u>	, , ,		240		
tgc	atc	ctc	acc	tac	aga	gat	ggc	ttc	aac	gtc	tcc	ato	ato	tat	aac		768
Cys	Ile	Leu	Thr	Tyr	Arg	Asp	Gly	Phe	Asn	Val	Ser	Ile	Met	Туг	Asn		
				245					250					255	5		
															tct		816
Leu	Thr	Val			Leu	Glu	Pro			Ser	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser		
			260					265					270				
tat	a a c	222	a.c.t	cac	3.03	+ ~ ~	000		+~~		~~-						
													_		Leu		864
		275				0,0	280		Cyb	110	7124	285		neu	neu		
ggg	gga	ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	acc	ctc		912
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu		
	290					295					300						
				acc													960
	тте	Ser	Arg	Thr		Glu	Val	Thr	Cys		Val	Val	Asp	Val			
305					310					315					320		
cac	αaa	gac	cct	gag	atc	aaq	ttc	aac	taa	tac	ata	a = c	996	ata	<b>~</b> ~ ~		1000
				Glu											-		1008
		•		325		•			330	-,-			Cly	335	010		
gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccg	cgg	gag	gag	cag	tac	aac	agc	acg		1056
				Lys													
			340					345					350				

tac	cgt	gtç	gto	agc	gto	ctc	acc	gto	ctg	cac	cag	gad	: tgg	cto	aat	1104
Tyr	Arg	Val	. Val	. Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	
		355	5				360					365	5			
ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	сса	gcc	ccc	1152
Gly	Lys	Glu	туг	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	
	370					375					380					
ātc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggg	cag	ccc	cga	gaa	cca	cag	1200
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	
385					390					395					400	
gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gag	gag	atg	acc	aag	aac	cag	gtc	1248
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	
				405					410					415		
agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	1296
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	yal	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	
			420					425					430			
gag	tgg	gag	agc	aat	ggg	cag	ccg	gag	aac	aac	tac	aag	acc	acg	cct	1344
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	
		435					440					445				
ccc	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tat	agc	aag	ctc	acc	1392
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	
	450					455					460					
gtg	gac	aag	agc	agg	tgg	cag	cag	ggg	aac	gtc	ttc	tca	tgc	tcc	gtg	1440
Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	
465					470					475					480	
atg	cat	gag	gct	ctg	cac	aac	cac	tac	acg	cag	aag	agc	ctc	tcc	ctg	1488
Met.	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	
				485					490					495		
tcc	ccg	ggt	aaa		tg	a										1503
Ser :	Pro	Gly	Lys													
			500													

<21	11>	500	)												
<21	12>	PRT	,												
<21	13>	Hom	o sa	pien	s										
< 4 0		8													
		p Gl	u Al			Lei	ي G1	y Le	u Le	u Ph	e Le	u Glr	n Pro	Le	ı Trp
1				!	5				1	0				15	5
Val	. Ala	a Pr			s Pro	Lev	ı Glr	n Pro	o G1	y Al	a Glu	ı Val	Pro	Val	l Val
			2	0				25	5				30		
<b></b>	71.	- 01				_									
iip	Ala			n CIZ	/ Ala	Pro			ı Le	u Pro	o Cys			Thr	Ile
		3	5				40	)				45			
Pro	To			. T.		T			_						
110	50		ı ASİ	э тес	ser	ьеи 55		Arc	, Ar	g Ala			Thr	Trp	Gln
	50	,				55					60	•			
His	Gln	Pro	) Asr	Ser	ะเรา	Pro	Pro	. Ala	- הר	. 71 -		C1	114 -	D	Leu
65				, 001	70	110	110	Ala	MIC	75		GIY	nıs	Pro	
					, ,					, .	,				80
Ala	Pro	Glv	, Pro	His	Pro	A)a	Ala	Pro	Ser	· 5er	Trp	Glv	Pro	7) ~~ ~	Dwo
				85					90		110	GIY	210	95	PIO
														,,,	
Arg	Arg	Tyr	Thr	Val	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Glv	Glv	Leu	Ara	Ser	Gly
			100					105		-	4		110		019
Arg	Leu	Pro	Leu	Gln	Pro	Arg	Val	Gln	Leu	Asp	Glu	Arg	Gly	Arg	Gln
		115					120					125	-	_	
Arg	Gly	Asp	Phe	Ser	Leu	Trp	Leu	Arg	Pro	Ala	Arg	Arg	Ala	Asp	Ala
	130					135					140				
Gly (	Glu	Tyr	Arg	Ala	Ala	Val	His	Leu	Arg	Asp	Arg	Ala	Leu	Ser	Cys
145					150					155					160
arg ]	Leu	Arg	Leu	Arg	Leu	Gly	Gln	Ala	Ser	Met	Thr .	Ala :	Ser :	Pro	Pro
				165					170				:	175	

<210> 8

G1	y Se	er	Let	1 Ar		a Se	r As	p Tr	p Va 18		e Le	u As:	n Cy	s Se:		e Ser
Ar	g Pi	ro	Asp 195		g Pr	o Ala	a Se	r Va		s Tr	p Ph	e Are	g As:	n Arq 5	Gly	y Gln
·G1	у Аз 21		Val	Pro	o Va	l Arç	g Gl: 21		r Pr	o Hi	s Hi	s His		u Ala	a Glu	ı Ser
Ph 22		ะบ	Phe	. Lei	ı Pr	o Glr 230		l Sei	Pro	o Me	t Ası 23		Gly	y Pro	Trp	Gly 240
Су	s Il	e :	Leu	Thi	ту: 245		ı Asp	o Gly	, Phe	250		l Ser	: Ile	e Met	Туг 255	
Lei	ı Th	r 7	Val	Leu 260		/ Leu	Glu	Pro	265		: Ser	Ala	Glu	270	_	Ser
Cys	s As		Lys 275	Thr	His	Thr	Cys	Pro 280		Cys	Pro	Ala	Pro 285	Glu	Leu	Leu
G17	7 Gl:		Pro	Ser	Val	Phe	Leu 295		Pro	Pro	Lys	Pro 300	Lys	Asp	Thr	Leu
Met 305		e S	er	Arg	Thr	Pro 310	Glu	Val	Thr	Cys	Val 315	Val	Val	Asp	Val	Ser 320
His	Glu	ı A	.sp	Pro	Glu 325	Val	Lys	Phe	Asn	Trp 330	Tyr	Val	Asp	Gly	Val 335	Glu
Val	His	A	sn	Ala 340	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg 345	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn 350	Ser	Thr
Tyr	Arg		al 55	Val	Ser	Val	Leu	Thr 360	Val	Leu	His	Gln	Asp 365	Trp	Leu	Asn
Gly	Lys 370	G:	lu <sub>.</sub>	Tyr	Lys		Lys 375	Val	Ser	Asn		Ala 380	Leu	Pro .	Ala	Pro
Tle	Glu	T.3	/S '	Thr	Tle	Ser	Tue	בות	Tuc	C1.,	C1 n	2=0	7\	Cl.	<b>.</b>	~ `

385 390 395 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val 405 410 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val 425 430 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro 440 445 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr 450 455 460 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val 465 470 475 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu 485 490 Ser Pro Gly Lys 500 <210> <211> 2211 <212> DNA <213> Homo sapiens <220> <221> sig\_peptide <222> (1)..(66) <220> <221> CDS <222> (1)..(2208) <223> LAG3-LAG3/Fc <400>

ât	g tg	g ga	g gc	t ca	g tt	c ct	g gg	c tt	g ct	g tt	t ct	g ca	ag co	g ct	t tgg	4	8
Me	t Tr	p Gl	u Al	a Gl	n Ph	e Le	u Gl	y Le	u Le	u Ph	e Le	eu Gl	ln Pi	o Le	u Trp	,	
	1				5				1	0				3	.5		
															g gtg	9	6
Va.	l Al	a Pr			s Pr	o Le	ı Glı	n Pro	o G1	y Al	a Gl	u Va	l Pr	o Va	l Val		
			2	0				2	5				3	0			
A																	
															a atc	14	4
111	) AI			a GI	y Ala	a Pro			ı Leı	ı Pr	о Су			o Th	r Ile		
		3.	5				4 C	)				4	5				
ccc	cto	r car		cto			- c+ c								g cag		
															g cag p Gln	192	?
	50					55		niç	L	, nr	- GI 6		1 1N	r rr	p Gin		
											Ü	Ü					
cat	cag	cca	gac	agt	ggc	ccq	ccc	act	acc	: ac	c cc	c aa	c ca	t cc	ctg	240	١
															) Leu	240	,
65					70					75					80		
gcc	ccc	ggc	cct	cac	ccg	gcg	gcg	ccc	tcc	tcc	tg:	g ggg	g cc	agg	ccc	288	
															Pro		
				85					90					95	•		
															ggg	336	
Arg	Arg	Tyr	Thr	Val	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gly	Gly	Leu	Arc	Ser	Gly		
			100					105					110	ŀ			
					ccc											384	
Arg	Leu		Leu	Gln	Pro	Arg		Gln	Leu	Asp	Glu			Arg	Gln		
		115					120					125					
cac	מממ	<b>~</b> = <b>~</b>	++0	t cc	at a	+~~	a+-										
					cta Leu											432	
9	130	۷.۰۰	1110	561	Deu	135	ъец	AIG	PIO	ATA	140	Arg	Ата	Asp	Ala		
	•					133					140						
ggc	gag	tac	cgc	gcc	gcg	qta	cac	ctc	agg	gac	cac	acc	ctc	tcc	tac	480	
Gly															-	400	
145					150					155					160		

cgc	ctc	cgt	ctg	cgc	ctg	ggc	cag	gcc	tcg	atg	act	gcc	ago	ccc	cca		528
Arg	Leu	Arg	Leu	Arg	Leu	Gly	Gln	Ala	Ser	Met	Thr	Ala	Ser	Pro	Pro		
				165					170					175			
															•		
gga	tct	ctc	aga	gcc	tcc	gac	tgg	gtc	att	ttg	aac	tgc	tcc	ttc	agc		576
Gly	Ser	Leu	Arg	Ala	Ser	Asp	Trp	Val	Ile	Leu	Asn	Cys	Ser	Phe	Ser		
			180					185					190				
cgc	cct	gac	cgc	cca	gcc	tct	gtg	cat	tgg	ttc	cgg	aac	cgg	ggc	cag		624
Arg	Pro	Asp	Arg	Pro	Ala	Ser	Val	His	Trp	Phe	Arg	Asn	Arg	Gly	Gln		
		195					200					205					
ggc	cga	gtc	cct	gtc	cgg	gag	tcc	ccc	cat	cac	cac	tta	gcg	gaa	agc		672
Gly	Arg	Val	Pro	Val	Arg	Glu	Ser	Pro	His	His	His	Leu	Ala	Glu	Ser		
	210					215					220						
			_			-	_	ccc	_	-							720
	Leu	Phe	Leu	Pro		Val	Ser	Pro	Met	_	Ser	Gly	Pro	Trp	_		
225					230					235					240		
	- 4	- 1															7.60
_					-	•		ttc					_				768
Cys	11e	Leu	Thr	_	Arg	Asp	СīУ	Phe		vaı	ser	11e	met	_	Asn		
				245					250					255			
cto	act	ct c	626	202	~~~	a c t	~~~	at a	666	a+ a	a+a	+ ~ ~	~~~	626	~~~		816
								gtc Val						_			010
Deu	1111	Deu	260	110	Gry		Giu	265	110	V & 1	Val	тър	270	GIII	GIU		
			200					200					2,0				
aaa	act	cct	acc	cag	ctc	ccc	tac	agc	ccc	aca	atc	ccc	ctc	cag	gat		864
	-		_	_			-	Ser							-		00.
		275					280					285					
ctc	agc	ctt	ctg	cga	aga	gca	ggg	gtc	act	tgg	cag	cat	cag	cca	gac		912
	_		_	_	_	_		Val			_		_		-		
	290					295					300				-		
agt	ggc	ccg	ccc	gct	gcc	gcc	ccc	ggc	cat	ccc	ctg	gcc	ccc	ggc	cct		960
Ser	Gly	Pro	Pro	Ala	Ala	Ala	Pro	Gly	His	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Pro		
305					310					315					320		

															c acg	1008
				325	•				330	)				335	5	
															ctg	1056
Val	rec	ser	340	GIY	PIO	GIY	GIY	345		Sei	. 617	/ Arg	350		) Leu	
cag	ccc	cgc	gtc	cag	ctg	gat	gag	cgc	ggc	cgg	caç	cgc	ggg:	gac	ttc	1104
Gln	Pro	Arg 355		Gln	Leu	Asp	Glu 360		Gly	Arg	Gln	365		Asp	) Phe	
															: cgc	1152
Ser	10 370		Leu	Arg	Pro	A1a 375	Arg	Arg	Ala	Asp	380		Glu	Tyr	` Arg	
															ctg	1200
385	Ala	Val	His	Leu	Arg 390	Asp	Arg	Ala	Leu	Ser 395	Cys	Arg	Leu	Arg	Leu 400	
						atg		_	-						_	1248
Arg	Leu	Gly	Gln	Ala 405	Ser	Met	Thr	Ala	Ser 410	Pro	Pro	Gl'n	Ser	Leu 415	Arg	
gcc	tcc	gac	tgg	gtc	att	ttg	aac	tgc	tcc	ttc	agc	cgc	cct	gac	cgc	1296
Ala	Ser	Asp	120	Val	Ile	Leu	Asn	Cys 425	Ser	Phe	Ser	Arg	Pro 430	Asp	Arg	
						ttc										1344
Pro	Ala	Ser 435	Val	His	Trp	Phe	Arg 440	Asn	Arg	Gly	Gln	Gly 445	Arg	Val	Pro	
						cac									_	1392
Val	Arg 450	Glu	Ser	Pro	His	His 455	His	Leu	Ala	Glu	Ser 460	Phe	Leu	Phe	Leu	
ccc	caa	gtc	agc	ccc	atg	gac	tct	ggg	ccc	tgg	ggc	tgc	atc	ctc	асс	1440
	Gln	Val	Ser			Asp	Ser	Gly			Gly	Cys	Ile	Leu		
465					470					475					480	

				Asn				Tyr					ctg Leu	1488
			Pro				Pro					Lys	act Thr	1536
		Pro				Pro					Gly	_	tca Ser	1584
	Leu	ttc Phe								Met			cgg Arg	1632
		gtc Val												1680
		ttc Phe												1728
		ccg Pro 580												1776
		acc Thr												1824
aag Lys		gtc Val		Asn										1872
atc Ile 625			Lys			-	Glu		_				_	1920

															tgc Cys	1968
			,	645				-,-	650				. 200	655		
															agc	2016
Leu	Val	Lys	660 Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp 665		Ala	a Val	. Glu	7rp		Ser	
aat	ggg	caq	cca	gag	aac	aac	tac	aaq	acc	. acc	cct	ccc	ata	cta	gac	2064
				Glu												2004
		675					680	-				685			•	
				ttc												2112
Ser		Gly	Ser	Phe	Phe		Tyr	Ser	Lys	Leu			Asp	Lys	Ser	
	690					695					700					
agg	tgg	cag	cag	ggg	aac	gtc	ttc	tca	tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	2160
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	
705					710					715					720	
cta	cac	220	cac	tac	a c a	C 2 G	220	200	cto	+00	c+ ~	+				0000
				Tyr												2208
				725			-,-		730	-		001	110	735	Lyo	
		tg a														2211
<210	)> 1	.0														
<211	> 7	36														
<212	> P	RT														
<213	> H	omo .	sapi	ens												
<400	> 1	0														
Met	Trp	Glu A	Ala (	3ln H	Phe :	Leu	Gly :	Leu :	Leu	Phe	Leu	Gln	Pro	Leu	Trp	
1				5					10					15		
Val :	Ala	Pro \	/al I	bys E	Pro 1	Leu (	Gln I	Pro (	Gly .	Ala	Glu	Val	Pro	Val '	Val	
			20					25					30			
Trp /	ela (	Gln G	Slu G	Sly A	la E	Pro 1	Ala G	Sln I	Leu :	Pro	Cys :	Ser	Pro '	Thr :	lle	

		35					40					45			
Pro	Leu 50		Asp	Leu	Ser	Leu 55	Leu	Arg	Arg	Ala	Gly 60		Thr	Trp	Gln
His 65	Gln	Pro	Asp	Ser	Gly 70		Pro	Ala	Ala	Ala 75		Gly	His	Pro	Leu 80
Ala	Pro	Gly	Pro	His 85	Pro	Ala	Ala	Pro	Ser 90		Trp	Gly	Pro	Arg 95	Pro
Arg	Arg	Tyr	Thr 100	Val	Leu	Ser	Val	Gly 105		Gly	Gly	Leu	Arg 110	Ser	Gly
Arg	Leu	Pro 115	Leu	Gln	Pro	Arg	Val 120	Gln	Leu	Asp	Glu	Arg 125	Gly	Arg	Gln
Arg	Gly 130	Asp	Phe	Ser	Leu	Trp 135	Leu	Arg	Pro	Ala	Arg 140	Arg	Ala	Asp	Ala
Gly 145	Glu	Tyr	Arg	Ala	Ala 150	Val	His	Leu	Arg	Asp 155	Arg	Ala	Leu	Ser	Cys 160
Arg	Leu	Arg	Leu	Arg 165	Leu	Gly	Gln	Ala	Ser 170	Met	Thr	Ala	Ser	Pro 175	Pro
Gly	Ser	Leu	Arg 180	Ala	Ser	Asp	Trp	Val 185	Ile	Leu	Asn	Cys	Ser 190	Phe	Ser
Arg	Pro	Asp 195	Arg	Pro	Ala	Ser	Val 200	His	Trp	Phe	Arg	Asn 205	Arg	Gly	Gln
Gly	Arg 210	Val	Pro	Val	Arg	Glu 215	Ser	Pro	His	His	His 220	Leu	Ala	Glu	Ser
Phe 225	Leu	Phe	Leu	Pro	Gln 230	Val	Ser	Pro	Met	Asp 235	Ser	Gly	Pro	Trp	Gly 240
Cys	Ile	Leu	Thr	Tyr 245	Arg	Asp	Gly	Phe	Asn 250	Val	Ser	Ile	Met	Tyr 255	Asn

Leu	Thr	Leu	Gln 260	Pro	Gly	Ala	Glu	Val 265		Val	Val	Trp	270		Glu
Gly	Ala	Pro 275	Ala	Gln	Leu	Pro	Cys 280		Pro	Thr	Ile	Pro 285		Gln	Asp
Leu	Ser 290		Leu	Arg	Arg	Ala 295	Gly	Val	Thr	Trp	Gln 300		Gln	Pro	Asp
	Gly	Pro	Pro	Ala		Ala	Pro	Gly	His			Ala	Pro	Gly	Pro
305					310					315					320
His	Pro	Ala	Ala	Pro 325	Ser	Ser	Trp	Gly	Pro 330	Arg	Pro	Arg	Arg	Tyr 335	Thr
Val	Leu	Ser	Val 340	Gly	Pro	Gly	Gly	Leu 345	Arg	Ser	Gly	Arg	Leu 350	Pro	Leu
Gln	Pro	Arg 355	Val	Gln	Leu	Asp	Glu 360	Arg	Gly	Arg	Gln	Arg 365	Gly	Asp	Phe
Ser	Leu 370	Trp	Leu	Arg	Pro	Ala 375	Arg	Arg	Ala	Asp	Ala 380	Gly	Glu	Tyr	Arg
Ala	Ala	Val	His	Leu	Arg	Asp	Arg	Ala	Leu	Ser	Cys	Arg	Leu	Arg	Leu
385					390					395					400
Arg	Leu	Gly	Gln	Ala 405	Ser	Met	Thr	Ala	Ser 410	Pro	Pro	Gly	Ser	Leu 415	Arg
Ala	Ser	Asp	Trp 420	Val	Ile	Leu	Asn	Cys 425	Ser	Phe	Ser	Arg	Pro 430	Asp	Arg
Pro	Ala	Ser 435	Val	His	Trp	Phe	Arg 440	Asn	Arg	Gly	Gln	Gly 445	Arg	Val	Pro
/al	Arg 450	Glu	Ser	Pro	His	His 455	His	Leu	Ala	Glu	Ser 460	Phe	Leu	Phe	Leu

Pro		n Va	l Se	r Pro	470		p Se:	r Gl	y Pro	77 Tr		y Cy:	s Ile	e Lei	Thr 480
Ту	r Ar	g As	p Gl	y Phe		n Va	l Se	r Il	e Met		Ası	ı Lei	a Thi	val 495	Leu S
Gly	y Lei	u Gli	u Pro		Thi	s Sei	r Ala	50:		o Lys	Sei	Cys	5 Asp		Thr
His	Th	r Cys 515		Pro	Cys	s Pro	520		o Glu	ı Lev	ı Lev	61 <sub>3</sub> 525		Pro	) Ser
Val	. Phe		ı Phe	e Pro	Pro	535		Lys	s Asp	Thr	Leu 540		: Ile	: Ser	Arg
Thr 545		Glu	ı Val	Thr	Cys 550		. Val	Val	Asp	Val 555		His	Glu	Asp	Pro 560
Glu	Va1	. Lys	Phe	8 Asn 565	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly 570		Glu	Val	His	Asn 575	Ala
Lys	Thr	Lys	Pro 580	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr 585		Ser	Thr	Tyr	Arg 590	Val	Val
Ser	Val	Leu 595		Val	Leu	His	Gln 600	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly 605	Lys	Glu	Tyr
Lys	Cys 610		Val	Ser	Asn	Lys 615	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro 620	Ile	Glu	Lys	Thr
Ile 625	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly 630	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro 635	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu 640
Pro	Pro	Ser	Arg	Glu 645	Glu	Met	Thr	Lys	Asn 650	Gln	Val	Ser	Leu	Thr 655	Cys
Leu	Val	Lys	Gly 660	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp 665	Ile	Ala	Val	Glu	Trp 670	Glu	Ser
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp

685

Ser			y Se	r Ph	e Ph			r Se	r Ly	s Le	u Th	r Va	l As	p Ly	s Ser	•	
	690	)				69	5				70	0					
Arg	Tr	G1:	n Gl:	n Gl	y Ası	n Val	l Ph	e Se	r Cy:	s Se	r Va	l Me	t Hi.	s Gl	ı Ala		
705	•				710	)				71	5				720		
Leu	His	: As:	n Hi:	з Ту:	r Thi	c Gli	n Lys	s Se:	r Lei	ı Se	r Leı	ı Se:	r Pro	o Gly	/ Lys		
				72					730					735	-		
<21 <21		11	l 173														
<21		Dì															
<21	3>	Н	omo s	apie	ens												
	•																
<220																	
<223 <223		CI		1470	. 1												
<223			)( FR2/		,												
- 400	2.																
<400		11		acc	atc	taa	acc	aca	ctg	000	ata	~~~	a+ =	~~~			4.0
									Leu								48
1				5		_			10			-		15			
									cag								96
Trp	Ala	Ala	Ala 20		Ala	Leu	Pro		Gln	Val	Ala	Phe			Tyr		
			20					25					30				
gcc	ccg	gag	ccc	ggg	agc	aca	tgc	cgg	ctc	aga	gaa	tac	tat	gac	cag		144
Ala	Pro	Glu	Pro	Gly	Ser	Thr	Cys	Arg	Leu	Arg	Glu	Tyr	Tyr	Asp	Gln		
		35					40					45					
aca	act	car	ato	tac	tac	age	222	tac	tca	cca	acc	C = =	C 2 +	ac -	222		100
Thr .																	192
				-	-		-	-	-								

680

675

	50	)				55	•			60	)				
	Phe					Ser				Asp				g gac Asp 80	240
					Leu				. Pro					tgt Cys	288
				Ser				Glu					Thr	cgg Arg	336
			Arg									Cys		ctg	384
						cgg Arg 135					Arg			cgc Arg	432
						aga Arg									480
					_	ggg ggg	_			-				-	<b>528</b>
						cag Gln									576
						gtc Val									624
atg Met													-		672

	210					215					220					
		-	_				_		_		_	cca Pro	_			720
225					230					235					240	
	_			_			_			-	-	ggg Gly	_			768
				245					250					255	-	
_	_					_	_					tgc Cys		_		816
110p		-	260	2,0	001	0,0		265				0,0	270		0,0	
	-		_		_			_		-		ctc Leu				864
110	YIG	275	GIU	Бей	Deu	GIY	280	110	Jei	<b>1</b>	1110	285	1110	110	110	
		_	_			_						gag Glu	_		_	912
БуЗ	290	2,5	пор		200	295		501	,, <u>r</u>	****	300	010			0,0	
		-	_		_		Ī	_				aag				960
305	Val	val	Asp	vai	310	nis	GIU	ASP	PIO	315	val	Lys	File	ASII	320	
		•							_	_		aag	-			1008
Tyr	vai	Asp	GIÀ	325	610	vai	HIS	AST	330	гÀг	THE	Lys	PIO	335	GIU	
_												ctc				1056
Glu	GIn	Tyr	340	Ser	Thr	Tyr	Arg	345	vai	ser	vaı	Leu	350	val	Leu	
cac	cag	gac	tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	1104
His	Gln	355	Trp	Leu	Asn	Gly	195 360	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys 365	Val	Ser	Asn	
	-			_								aaa				1152
٦٧S	r.ıa	ьeu	PIO	нта	PIO	тте	GIU	r À2	inr	тте	ser	Lys	⊬.⊥ā	тÀг	eιλ	

	370	)				375	5				380	)					
Cac	ccc			cca		at a	+	2.00									
									ctg Leu								1200
385	110	nry	GIU	110	390		. IYI	1111	Leu			ser	Arg	Asp			
303					390					395					400		
ctg	acc	aag	aac	cag	gtc	ago	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tat		1248
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr		
				405					410					415			
									agc								1296
Pro	Ser	Asp		Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn		
			420					425					430				
aac	tac	aag	acc	acq	cct	ccc	ata	cta	gac	tcc	gac	aac	tcc	tcc	ttc		1344
									Asp								1011
		435					440		•			445		001			
ctc	tac	agc	aag	ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg	tgg	cag	cag	ggg	aac		1392
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn		
	450					455					460						
gtc																	1440
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr		
465					470					475					480		
cag	220	200	ctc	+	cta	t ot	200	~~+									
Gln											tga						1473
<b>01</b> 11	Dy 3	Jei	шец	485	neu	Ser	FIO	СТУ	ьуs 490								
				403					490								
<210	> 1	2															
<211	> 4	90															
<212:	> P	RT															
<213	> H	omo	sapi	ens													
<400>	> 12	2															
let A			Val 7	Ala v	Va) 1	Fro 2	Ala z	ו בו	en 1	ז בני	/al (	:1v 7		21,, 1			
1			•	5			/		10	\	· a 1 (	ו עיי	Jeu (	15	Jeu		
														13			

Trp	Ala	Ala	Ala 20		Ala	Leu	Pro	Ala 25		u Val	Ala	Ph€	Thr		Tyr
Ala	Pro	Glv 35	ı Pro	Gly	Ser	Thr	Cys 40		Leu	ı Arç	, Glu	Туг 45		Asp	Gln
Thr	Ala 50		n Met	Cys	Cys	Ser 55		Cys	Ser	Pro	Gly 60		His	Ala	Lys
Val 65		Cys	Thr	Lys	Thr 70	Ser	Asp	Thr	Val	Cys		Ser	Cys	Glu	Asp 80
Ser	Thr	Tyr	Thr	Gln 85		Trp	Asn	Trp	Val 90		Glu	Cys	Leu	Ser 95	_
Gly	Ser	Arg	Cys 100	Ser	Ser	Asp	Gln	Val 105	Glu	Thr	Gln	Ala	Cys 110	Thr	Arg
Glu	Gln	Asn 115	Arg	Ile	Cys	Thr	Cys 120	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr 125		Ala	Leu
Ser	Lys 130	Gln	Glu	Gly	Cys	Arg 135	Leu	Cys	Ala	Pro	Leu 140	Arg	Lys	Cys	Arg
Pro 145	Gly	Phe	Gly	Val	Ala 150	Arg	Pro	Gly	Thr	Glu 155	Thr	Ser	Asp	Val	Val 160
Cys	Lys	Pro	Cys	Ala 165	Pro	Gly	Thr	Phe	Ser 170	Asn	Thr	Thr	Ser	Ser 175	Thr
Asp	Ile	Cys	Arg 180	Pro	His	Gln	Ile	Cys 185	Asn	Val	Val	Ala	Ile 190	Pro	Gly
Asn	Ala	Ser 195	Met	Asp	Ala	Val	Cys 200	Thr	Ser	Thr	Ser	Pro 205	Thr	Arg	Ser
1et	Ala 210	Pro	Gly	Ala		His 215	Leu	Pro	Gln	Pro	Val 220	Ser	Thr	Arg	Ser
ln	His	Thr	Gln	Pro	Thr	Pro	Glu	Pro	Ser	Thr	Ala	Pro	Ser	Thr	Ser

225					230	i				235	5				240	,
Phe	Lev	ı Lev	Pro	Met 245		Pro	Ser	Pro	250		a Glu	ı Gl	y Se	r Th	r Gly 5	
Asp	Ala	ı Glu	260		Ser	Cys	Asp	265		His	Thi	c Cys	s Pro 270		o Cys	
Pro	Ala	275		Leu	Leu	Gly	Gly 280		Ser	· Val	. Ph∈	285		e Pro	o Pro	
Lys	Pro 290		Asp	Thr	Leu	Met 295		Ser	Arg	Thr	300		ı Va	l Thi	r Cys	
Val 305	Val	Val	Asp	Val	Ser 310	His	Glu	Asp	Pro	Glu 315		. Lys	s Phe	e Ası	320	
Tyr	Val	Asp	Gly	Val 325	Glu	Val	His	Asn	Ala 330	Lys	Thr	Lys	Pro	335	g Glu	
Glu	Gln	Tyr	Asn 340	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val 345	Val	Ser	Val	Leu	350		. Leu	
His	Gln	Asp 355	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys 360	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys 365		Ser	Asn	
Lys	Ala 370	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile 375	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser 380	Lys	Ala	Lys	Gly	
Gln 885	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln 390	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro 395	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu 400	
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln 405	Val	Ser	Leu	Thr	Cys 410	Leu	Val	Lys	Gly	Phe 415	Tyr	
ro	Ser	Asp	Ile 420	Ala	Val	Glu	Trp	Glu 425	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro 430	Glu	Asn	
sn '	Tyr	Lys 435	Thr	Thr	Pro :		Val 440	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly 445	Ser	Ser	Phe	

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn 450 460  Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr 465 470 475 480  Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 485 490 <pre> </pre> <pre> <pre> </pre> <pre> <pre> <pre> </pre> <pre> </pre> <pre> <pre> </pre> <pre> </pre> <pre> <pre> </pre> <pre> <pre> <pre> </pre> <pre> </pre> <pre> <pre> <pre> <pre> </pre> <pre> <pre> <pre> <pre> <pre> </pre> <pre> /pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre></pre>
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr 465 470 475 480  Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 485 490 <pre> &lt;210&gt; 13 &lt;211&gt; 2163 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; Homo sapiens  </pre> <pre> &lt;220&gt; &lt;221&gt; CDS &lt;222&gt; (1)(2160) &lt;223&gt; TNFR2-TNFR2/Fc  </pre> <400> 13 atg gcg ccc gtc gcc gtc tgg gcc gcg ctg gcc gtc gga ctg gag ctc Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu 1 5 10 15  tgg gct gcg gcg cac gcc ttg ccc gcc cag gtg gca ttt aca ccc tac Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
A65
A65
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 485 490 <pre> &lt;210&gt; 13 &lt;211&gt; 2163 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; Homo sapiens  </pre> <pre> &lt;220&gt; &lt;221&gt; CDS &lt;222&gt; (1)(2160) &lt;223&gt; TNFR2-TNFR2/Fc  </pre> <pre> &lt;400&gt; 13 atg gcg ccc gtc gcc gtc tgg gcc gcg ctg gcc gtc gga ctg gag ctc Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu 1 5 10 15  tgg gct gcg gcg cac gcc ttg ccc gcc cag gtg gca ttt aca ccc tac Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr </pre>
<pre>485 490  &lt;210&gt; 13 &lt;211&gt; 2163 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; Homo sapiens  &lt;220&gt; &lt;221&gt; CDS &lt;222&gt; (1)(2160) &lt;223&gt; TNFR2-TNFR2/Fc  &lt;400&gt; 13 atg gcg ccc gtc gcc gtc tgg gcc gcg ctg gcc gtc gga ctg gag ctc Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu 1 5 10 15  tgg gct gcg gcg cac gcc ttg ccc gcc cag gtg gca ttt aca ccc tac Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr</pre>
<pre>&lt;210&gt; 13 &lt;211&gt; 2163 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; Homo sapiens  &lt;220&gt; &lt;221&gt; CDS &lt;222&gt; (1)(2160) &lt;223&gt; TNFR2-TNFR2/Fc  &lt;400&gt; 13 atg gcg ccc gtc gcc gtc tgg gcc gcg ctg gcc gtc gga ctg gag ctc Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu 1 5 10 15  tgg gct gcg gcg cac gcc ttg ccc gcc cag gtg gca ttt aca ccc tac Trp Ala Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr</pre>
<pre>&lt;211&gt; 2163 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; Homo sapiens  </pre> <pre>&lt;220&gt; &lt;221&gt; CDS &lt;222&gt; (1)(2160) &lt;223&gt; TNFR2-TNFR2/Fc  </pre> <pre> &lt;400&gt; 13 atg gcg ccc gtc gcc gtc tgg gcc gcg ctg gcc gtc gga ctg gag ctc Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu 1</pre>
<pre>&lt;211&gt; 2163 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; Homo sapiens  </pre> <pre>&lt;220&gt; &lt;221&gt; CDS &lt;222&gt; (1)(2160) &lt;223&gt; TNFR2-TNFR2/Fc  </pre> <pre> &lt;400&gt; 13 atg gcg ccc gtc gcc gtc tgg gcc gcg ctg gcc gtc gga ctg gag ctc Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu 1</pre>
<pre>&lt;211&gt; 2163 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; Homo sapiens  </pre> <pre>&lt;220&gt; &lt;221&gt; CDS &lt;222&gt; (1)(2160) &lt;223&gt; TNFR2-TNFR2/Fc  </pre> <pre> &lt;400&gt; 13 atg gcg ccc gtc gcc gtc tgg gcc gcg ctg gcc gtc gga ctg gag ctc Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu 1</pre>
<pre>&lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; Homo sapiens  </pre> <pre> &lt;220&gt; &lt;221&gt; CDS &lt;222&gt; (1)(2160) &lt;223&gt; TNFR2-TNFR2/Fc  </pre> <pre> &lt;400&gt; 13 atg gcg ccc gtc gcc gtc tgg gcc gcg ctg gcc gtc gga ctg gag ctc Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu 1</pre>
<pre> &lt;220&gt; &lt;221&gt; CDS &lt;222&gt; (1)(2160) &lt;223&gt; TNFR2-TNFR2/Fc  </pre> <pre> &lt;400&gt; 13 atg gcg ccc gtc gcc gtc tgg gcc gcg ctg gcc gtc gga ctg gag ctc Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu 1 5 10 15  tgg gct gcg gcg cac gcc ttg ccc gcc cag gtg gca ttt aca ccc tac Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr </pre>
<pre>&lt;220&gt; &lt;221&gt; CDS &lt;222&gt; (1)(2160) &lt;223&gt; TNFR2-TNFR2/Fc  &lt;400&gt; 13 atg gcg ccc gtc gcc gtc tgg gcc gcg ctg gcc gtc gga ctg gag ctc Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu 1 5 10 15  tgg gct gcg gcg cac gcc ttg ccc gcc cag gtg gca ttt aca ccc tac Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr</pre>
<pre>&lt;221&gt; CDS &lt;222&gt; (1)(2160) &lt;223&gt; TNFR2-TNFR2/FC  </pre> <pre>&lt;400&gt; 13 atg gcg ccc gtc gcc gtc tgg gcc gcg ctg gcc gtc gga ctg gag ctc Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu 1</pre>
<pre>&lt;221&gt; CDS &lt;222&gt; (1)(2160) &lt;223&gt; TNFR2-TNFR2/FC  </pre> <pre>&lt;400&gt; 13 atg gcg ccc gtc gcc gtc tgg gcc gcg ctg gcc gtc gga ctg gag ctc Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu 1</pre>
<pre>&lt;222&gt; (1)(2160) &lt;223&gt; TNFR2-TNFR2/Fc  &lt;400&gt; 13 atg gcg ccc gtc gcc gtc tgg gcc gcg ctg gcc gtc gga ctg gag ctc Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu 1 5 10 15  tgg gct gcg gcg cac gcc ttg ccc gcc cag gtg gca ttt aca ccc tac Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr</pre>
<pre>&lt;223&gt; TNFR2-TNFR2/Fc  &lt;400&gt; 13 atg gcg ccc gtc gcc gtc tgg gcc gcg ctg gcc gtc gga ctg gag ctc Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu 1</pre>
<pre>&lt;400&gt; 13 atg gcg ccc gtc gcc gtc tgg gcc gcg ctg gcc gtc gga ctg gag ctc Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu 1</pre>
<pre>&lt;400&gt; 13 atg gcg ccc gtc gcc gtc tgg gcc gcg ctg gcc gtc gga ctg gag ctc Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu 1</pre>
atg gcg ccc gtc gcc gtc tgg gcc gcg ctg gcc gtc gga ctg gag ctc  Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu  1 5 10 15  tgg gct gcg gcg cac gcc ttg ccc gcc cag gtg gca ttt aca ccc tac  Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu  1 5 10 15  tgg gct gcg gcg cac gcc ttg ccc gcc cag gtg gca ttt aca ccc tac Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
tgg gct gcg gcg cac gcc ttg ccc gcc cag gtg gca ttt aca ccc tac Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
tgg gct gcg gcg cac gcc ttg ccc gcc cag gtg gca ttt aca ccc tac 96 Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
20 25 30
gcc ccg gag ccc ggg agc aca tgc cgg ctc aga gaa tac tat gac cag 144
gcc ccg gag ccc ggg agc aca tgc cgg ctc aga gaa tac tat gac cag 144  Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
35 40 45
aca gct cag atg tgc tgc agc aaa tgc tcg ccg ggc caa cat gca aaa 192
Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
50 55 60
gtc ttc tgt acc aag acc tcg gac acc gtg tgt gac tcc tgt gag gac 240

		Cys	Thi	Lys			Asp	Thr	· Val	_	_	Se:	c Cys	Glu	Asp	
65	•				70	)				75	•				80	
ago	aca	tac	acc	cag	cto	tgg	aac	: tgg	gtt	ccc	gaç	g tgo	c ttg	gago	tgt:	288
Ser	Thr	Туг	Thr	Glr	Let	Trp	Asr	Trp	val	Pro	Glu	Cy:	s Lei	s Ser	Cys	
				85	5				90	)				95	5	
~~~																
													-		cgg Arg	336
,		9	100				01.	105			. 011		110		. Alg	
gaa	cag	aac	cgc	ato	tgc	acc	tgc	agg	ccc	ggc	tgg	tac	: tgc	gcg	ctg	384
Glu	Gln			Ile	Cys	Thr	Cys	Arg	Pro	Gly	Trp	Туг	Cys	Ala	Leu	
		115					120					125	•			
agc	aag	caq	gag	aaa	tac	caa	cta	tgc	aca	cca	cta	cac	: aag	tac	cac	432
								Cys				_	_	_	_	152
	130					135		_			140	_	-	•	_	
								gga								480
	Gly	Phe	Gly	Val		Arg	Pro	Gly	Thr	Glu	Thr	Ser	Asp	Val	Val	
145					150					155					160	
tac	aaσ	ccc	tat	acc	cca	aaa	acσ	ttc	tcc	aac	aco	act	tca	tcc	aca	528
					_		-	Phe			-				_	020
				165					170					175		
								tgt								576
Asp	Ile	Cys		Pro	His	Gln	Ile	Cys	Asn	Val	Val	Ala		Pro	Gly	
			180					185					190			
aat	gca	agc	atg	gat	gca	gtc	tgc	acg	tcc	acg	tcc	ccc	acc	caa	agt	624
Asn	Ala	Ser	Met	Asp	Ala	Val	Cys	Thr	Ser	Thr	Ser	Pro	Thr	Arg	Ser	
		195					200					205				
								ccc								672
		Pro	Gly	Ala	Val		Leu	Pro	Gln	Pro		Ser	Thr	Arg	Ser	
	210					215					220					
caa	cac	acg	cag	cca	act	cca	gaa	ccc	agc	act	gct	сса	agc	acc	tcc	720

Glr	n His	s Th	r Glr	n Pro	Thi	Pro	Glu	Pro	s Se	r Th	r Al	a Pr	o Se	r Th	r Ser	
225	5				230	)				23	5				240	
tto	cto	g ct	c cca	ato	ggg	ccc	ago	cco	cc	a gc	t ga	a gg	g ag	c gg	a tcc	768
Phe	. Let	ı Leı	ı Pro	Met	: G1 <sub>3</sub>	Pro	Ser	Pro	Pr	o Ala	a Gl	u Gl	y Se	r Gl	y Ser	
				245					25			•		25		
aac	: gca	act	aca	ccc	: tac	gco	ccq	gad	CC	c gad	a a or	c aca	a ta	c ca	g ctc	816
															J Leu	
			260		-			265					270		,	
aga	gaa	tac	: tat	gac	caq	aca	act	cad	ato	ı tac	ta:	ago	aaa	a tac	tcg	864
														_	Ser	001
		275		•			280			,-	. 0,10	285	-	, cy.	, 501	
ccq	ggc	caa	cat	qca	aaa	atc	ttc	tat	acc	aac	acc	tco	ı dəc	: acc	gtg	912
							Phe						_			
	290					295		0,0	••••		300				Val	
											500					
tat	gac	tcc	tat	gag	gac	agc	aca	tac	acc	cad	ctc	taa		taa	att	960
							Thr								-	200
305	•		-,-		310			- , -		315			71011	112	320	
															520	
ccc	αaα	tac	tta	agc	tat	aac	tcc	cac	tat	aαc	tct	gac	can	at a	caa	1008
							Ser						_		-	1000
		-		325	-				330					335	010	
act	caa	qcc	tac	act	caa	gaa	cag	aac	cac	atc	tac	acc	tac	agg	ccc.	1056
							Gln									1000
			340					345	5		-3-		350	9		
ggc	tgg	tac	tgc	gcg	ctq	agc	aag	caq	gag	aaa	tac	caa	cta	tac	aca	1104
							Lys									110.
_	-	355	-				360			•	- 2 -	365		-,-		
ccq	ctq	cac	aaq	tac	cac	cca	ggc	ttc	aac	ata	acc	aga	cca	aaa	act	1152
							Gly									1132
	370		-	-		375	2	-	3		380	<del>-</del> <del>-</del> <del>-</del> <del>-</del> <del>-</del> <del>-</del> <del>-</del> <del>-</del> <del>-</del> <del></del>	0	1		
gaa	aca	tca	σac	ato	ata	tac	aan 4	aaa	tat	acc	cca	aaa	eca	ttc	T.C.C	1200
J			,	3 - 5	3~9	- 50	'		-90	900	9	323	9			1200

Gli	ı Thi	Se	r Asp	o Val	l Va	l Cys	Ly	s Pro	с Су	s Ala	a Pro	o G1	y Th	r Ph	e Ser		
385	5				390	)				39	5				400		
														_	t aac		1248
Asr	Thi	Th	: Sei			r Asp	) Ile	e Cys			o His	s Gl	n Ile		s Asn		
				405	)				410	)				41	5		
ato	ato	acc	: ato	cct		aat	aca	a a a c	· atr	ten r	. ac:	a ata	- ta		g tcc		1296
													_		s Ser		1290
			420					425		- 11-			430		. 001		
acg	tcc	ccc	acc	cgg	agt	atg	gco	сса	ggg	gca	gta	a cac	: tta	cco	cag		1344
Thr	Ser	Pro	Thr	Arg	Ser	Met	Ala	Pro	G13	/ Ala	Va]	His	Lev	Pro	Gln		
		435	)				440	)				445	5				
															agc		1392
Pro			Thr	Arg	Ser			Thr	Gln	Pro			Glu	Pro	Ser		
	450					455					460	,					
act	gct	cca	agc	acc	tcc	ttc	ctq	ctc	cca	atq	aac	ccc	: agc	ccc	cca		1440
								Leu									
465					470					475					480		
								gag				_	-				1488
Ala	Glu	Gly	Ser	Thr	Gly	Asp	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr		
				485					490					495			
Cac	202	t 00	000	000	+ ~ ~	~~~	~~~	cct	~~~	-+-					£		
								Pro						_			1536
		-,-	500		0,0			505		Deu	200	O <sub>T</sub> y	510	110	261		
																·	
gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	сса	aaa	ccc	aag	gac	acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg		1584
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg		
		515					520					525					
								gtg									1632
ľhr		Glu	Val	Thr	Cys		Val	Val	Asp	Val		His	Glu	Asp	Pro		
	530					535					540						
nac	atc	aan	ttc	aac	taa	tac	ata	gac	aac	ata	aaa	ctc	C=+	22+	200		1600
,~9	y - V				-53		3 - 3	200	290	9.9	yay	gry	Cal	act	gee		1680

G1:	u Va	l Ly	s Ph	e As	n Tr	р Ту	r Va	l Ası	p Gl	y Va	1 G1	u Va	1 Hi	s As	n Ala	
54.					55					55					560	
aa	g ac	a aa	g cc	g cg	g ga	g ga	g ca	g tad	c aad	ag	c ac	g ta	c cg	g gt	g gtc	1728
														-	l Val	
				56				-	570			-		57		
															-	
ago	gto	c ct	c ac	gt	c ct	g ca	c cad	g gad	t qc	cto	g aa	t aa	c aa	a as	g tac	1776
															u Tyr	27.0
			580					585					59		] -	
														•		
aag	, tg	c aa	ggto	tc	c aad	: aaa	a gco	cto	: cca	aco	2 000	: at	c gad	a aa	a acc	1824
															s Thr	1024
_	-	595					600					60		- ~y.		
								-					_			
ato	tcc	: aaa	a acc	: aaa	a aac	cac	7 000	. cga	gaa	CCA	a cac	n ata	tac		ctg	1872
															Leu	1872
	610				,	615			014		620		Llyi	. 1111	. Deu	
											020					
ccc	cca	tec	caa	gat	gag	cta	acc	. aag	220	cad	ato	. 200			tgc	1020
								Lys					_		-	1920
625			9		630			275	710	635		Ser	. Dec	1 1111	640	
										055					040	
ctq	qtc	aaa	aac	ttc	: tat	ccc	agc	gac	atc	acc	ata	gan	taa	a a a	. 200	1968
								Asp								1906
		_		645					650		,	014	110	655		
									000					033		
aat	ggg	cag	cca	aaa	aác	aac	tac	aag	acc	aco	cct	ccc	ata	cta	~ a c	2016
								Lys								2016
	-		660				- , -	665		****	110	110	670	пец	лър	
								000					0,0			
tcc	gac	aac	tcc	tcc	ttc	ctc	tac	agc	220	ctc	3.00	ata	a = c	224	200	2064
								Ser								2064
		675					680	001	_,,	200	1111	685	лэр	БУЗ	261	
												000				
agq	tgq	caq	caq	gaa	aac	qtc	ttc	tca	tac	tec	ata	ato	cat	nan	ac+	2112
								Ser								2112
-	690			2		695			-, 0		700		****	J 1 U	a	
							•				, 50					
cta	cac	aac	cac	tac	aca	cao	aag	agc ·	ctc ·	tcc	cta	+ + +	CC2	~~+	222	21.60
- 2					9	9	9	~9C			cry	CCL	ccy	ggr	aad	2160

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 705 710 715 tga 2163 <210> 14 <211> 720 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 14 Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu 10 Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr 20 25 Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln 40 Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys 55 Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp 70 75 Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys 85 90 Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg 105 Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu 120 Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg 135 140

Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val

.14	5					15	0				15	5				160
Су	s Ly	s F	Pro	Су	s Al 16		o G1	y Th		e Se 17		n Thi	r Th	r Se	r Se 17	r Thr
Ası	o Il	e C	ys	Ar		o Hi	s Gl	n Il	e Cy 18		n Vai	l Val	L Ala	a Il		o Gly
Ası	n Al		er 95	Me	t As	p Ala	a Va	1 Cy 20		r Se:	r Thi	Ser	205		r Ar	g Ser
Met	21		ro	Gly	/ Ala	a Val	1 Hi		u Pro	o Glr	n Pro	Val 220		Th:	r Ar	g Ser
Gln 225		s T	hr	Glr	n Pro	230		o Gli	ı Pro	Sei	Thr 235		Pro	Ser	Th:	Ser 240
Phe	Lei	ı Le	eu	Pro	Met 245		Pro	Ser	Pro	250		Glu	Gly	Ser	Gly 255	Ser
Asn	Ala	Tì		Thr 260		Tyr	Ala	Prc	Glu 265		Gly	Ser	Thr	Cys 270		Leu
Arg	Glu	T)		Tyr	Asp	Gln	Thr	Ala 280		Met	Cys	Cys	Ser 285	Lys	Cys	Ser
Pro	Gly 290		n :	His	Ala	Lys	Val 295	Phe	Cys	Thr	Lys	Thr 300	Ser	Asp	Thr	Val
Cys 305	Asp	Se	r (	Cys	Glu	Asp 310	Ser	Thr	Tyr	Thr	Gln 315	Leu	Trp	Asn	Trp	Val 320
Pro	Glu	Су	s I	Leu	Ser 325	Cys	Gly	Ser	Arg	Cys 330	Ser	Ser	Asp	Gln	Val 335	Glu
Thr	Gln	Ala		ys 140	Thr	Arg	Glu	Gln	Asn 345	Arg	Ile	Cys		Cys 350	Arg	Pro
Gly	Trp	Туз 355		ys	Ala	Leu	Ser	Lys 360	Gln	Glu	Gly		Arg	Leu	Cys	Ala

Pro	o Le 37		g Ly	s Cy	s Arç	375		y Ph	e Gl	y Vai	1 Ala 380		g Pro	o Gl	y Thr
Gl:		r Se	r As	p Vai	1 Val		s Lys	s Pro	o Cys	395		Gly	Th:	r Phe	e Ser 400
Asr	Th:	r Th	r Se	r Sei 40		: Asp	) Ile	е Суя	s Arç 410		) His	Gln	ılle	e Cys 41:	s Asn
Val	. Vai	l Ala	a Ile 420		Gly	Asn	ı Ala	1 Sei 425		: Asp	Ala	Val	Cys		Ser
Thr	Sei	Pro 435		c Arg	, Ser	Met	Ala 440		Gly	' Ala	Val	His		Pro	Gln
Pro	Val		Thi	Arg	Ser	Gln 455	His	Thr	Gln	Pro	Thr 460	Pro	Glu	Pro	Ser
Thr 465		Pro	Ser	Thr	Ser 470	Phe	Leu	Leu	Pro	Met 475	Gly	Pro	Ser	Pro	Pro 480
Ala	Glu	Gly	Ser	Thr 485	Gly	Asp	Ala	Glu	Pro 490	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys 495	Thr
His	Thr	Cys	Pro		Cys	Pro	Ala	Pro 505	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly 510	Pro	Ser
Val	Phe	Leu 515	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro 520	Lys	Asp	Thr		Met 525	Ile	Ser	Arg
Thr	Pro 530	Glu	Val	Thr	Cys	Val 535	Val	Val	Asp	Val	Ser 540	His	Glu	Asp	Pro
Glu 545	Val	Lys	Phe	Asn	Trp 550	Tyr	Val	Asp	Gly	Val 555	Glu	Val	His	Asn	Ala 560
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg 565	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn 570	Ser	Thr 1	Tyr .		Val 575	Val

Ser	Val	Leu	Thr 580		Leu	His	Gln	Asp 585		Leu	. Asn	Gly	Lys 590		Tyr	
Lys	Cys	Lys 595	Val	Ser	Asn	Lys	Ala 600	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile 605		Lys	Thr	
Ile	Ser 610		Ala	Lys	Gly	Gln 615		Arg	Glu	Pro	Gln 620		Tyr	Thr	Leu	
Pro 625	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu 630	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln 635	Val	Ser	Leu	Thr	Cys 640	
Leu	Val	Lys	Gly	Phe 645	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile 650	Ala	Val	Glu	Trp	Glu 655	Ser	
Asn	Gly	Gln	Pro 660	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys 665	Thr	Thr	Pro	Pro	Val 670	Leu	Asp	
Ser	Asp	Gly 675	Ser	Ser	Phe	Leu	Tyr 680	Ser	Lys	Leu	Thr	Val 685	Asp	Lys	Ser	
	Trp 690	Gln•	Gln	Gly	Asn	Val 695	Phe	Ser	Cys	Ser	Val 700	Met	His	Glu	Ala	
Leu 705	His	Asn	His	Tyr	Thr 710	Gln	Lys	Ser		Ser 715	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys 720	
(210) (211) (212) (213)	> >	15 131 DNA Home		pien	s											
220>	>															
221>	>	CDS														
222>	>	(1)	(13	311)												
223>	>	CD2	/Fc													
400>	,	15														

atg	ag	c tt	t cc	a tg	t aa	a tt	t gt	a gc	c ag	c tt	c ct	t ct	gat	t tt	c aa	ŧt	48
Met	Se	r Ph	e Pr	о Су	s Ly	s Ph	e Va	1 A1	a Se	r Ph	e Le	u Le	u I)	e Pi	ne As	sn	
1					5				1	0				1	1.5		
								c aaa							-		96
val	Sei	r Sei			/ A1	a Va	l Se	r Lys		u Ile	e Th	r As			u Gl	.น	
			20	J				25	•				3	0			
acc	tac	a aat	acc	: tto	. aa1	t ca	o da	c ato	: aar	· ttr	י מא	r at	t cc	÷ =0	+ ++	<b>+</b>	3.4.4
								o Ile									144
		35					4 (					4					
caa	atg	agt	gat	gat	att	gad	gat	: ata	aaa	tgg	g gaa	a aa	a ac	t tc	a ga	С	192
Gln	Met	Ser	Asp	Asp	Ile	e Asp	Asp	Ile	Lys	Trp	Glu	ı Ly	s Th	r Se	r As	p	
	50					55	5				60	)					
								aaa -									240
ьуs 65	ьys	ьуѕ	116	Ala			Arg	Lys	Glu			Thi	r Phe	≥ Ly			
05					70					75					8(	0	
aaa	gat	aca	tat	aag	cta	ttt	aaa	aat	aaa	act	cta	aaa	a att	- 220	r cat	-	288
								Asn									200
				85					90			<del></del>		95			
								tac									336
Leu	Lys	Thr		Asp	Gln	Asp	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Ile	Tyr	Asp	Thr		
			100					105					110				
222	~~=	222	22+	~+~	++~	~											
								ata Ile									384
-10	<b>-</b> 1	115	71011	Vul	Deu	GIU	120	116	FILE	Asp	Ten	125	11e	GID	GIU		
												123					
agg	gtc	tca	aaa	cca	aag	atc	tcc	tgg	act	tgt	atc	aac	aca	acc	ctq		432
								Trp							-		
:	130					135					140						
								gac									480
	Cys	Glu	Val			Gly	Thr	Asp			Leu	Asn	Leu	Tyr	Gln		
145					150					155					160		

				s Le	u Ly										g tgg s Trp	528
				16	55				17	0				17	5	
															a gtc	576
Th	r Th	r Se	er Le 18		r Al	a Lys	s Phe	Lys 185		s Th	r Al	a Gl			s Val	
			10	.0				105	•				19	U		
ag	c aa	g ga	a to	c ag	t gt	c gaç	cct	gto	ago	tgt	cci	t gc	a ga	g cc	c aaa	624
Se	r Ly	s Gl	u Se	r Se	r Va	l Glu	Pro	Val	Sea	Cys	s Pro	o Al	a Gl	ı Pro	Lys	
		19	5				200					20	5			
															e ctc	672
Se			p Ly	s Th	r His			Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	a Pro	Gli	1 Leu	
	210	)				215					220	)				
cto	g ggg	g gg	a cc	g tc	a gto	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	cci	aac	gac	acc	720
													-	-	Thr	
225	5				230	)				235					240	
a+ -																
						cct Pro										768
				245		110	914	Vai	250	Суз	vaı	vai	. val	255		
						gtc										816
Ser	His	Glı			Glu	Val	Lys		Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	
			260	)				265					270			
gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccg	cgg	gag	gag	cag	tac	aac	agc	864
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	
		275					280					285				
acq	tac	cqq	ata	atc	agc	gtc	ctc	acc	atc	cta	cac	can	a a c	taa	cta	912
						Val									-	912
	290					295					300		- 4			
						tgc									_	960
305	σιу	ъys	GIU	Tyr	1ys 310	Cys	rys /	√al :			Lys	Ala	Leu	Pro		
505					310					315					320	

ccc	ato	gag	g aaa	acc	ato	tcc	aaa	gcc	aaa	ggg	g cag	ccc	cga	gaa	cca	1008
Pro	Ile	e Glu	l Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	/ Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	
				325	•				330	1				335	,	
cag	gto	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gat	gag	ctg	acc	aag	aac	cag	1056
Gln	Va 1	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	
			340					345					350			
gtc	ago	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	gcc	1104
			Thr												_	
		355					360			-		365				
gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggg	cag	ccg	qaq	aac	aac	tac	aaσ	acc	aca	1152
			Glu												_	-102
	370					375				•	380	- 3 -	-,,			
											•••					
cct	CCC	ata	ctg	gac	tec	gac	aac	ticc	ttc	ttc	ctc	tac	200	220	ctc	1200
			Leu													1200
385					390		OI,	501	1110	395	Бец	+ Y L	261	ту	400	
					000					3,3					400	
acc	ata	gac	aag	age	agg	taa	cad	cac	aaa	220	at c	++~	+00	+~~	+	1040
			Lys													1248
			2,5	405	711.9	11p	GIII	GIII	410	ASII	vaı	FIIE	Sei	-	ser	
				105					410					415		
ata	ato	cat	gag	act	cta	C 3 C	220	63.6	+ > 0	200	~~~					1006
			Glu													1296
Vai	116 C	1123	420	A10	Deu	птэ	ASII		ıyı	mr	GIN	гуs		ьeu	Ser	
			420					425					430			
cta	+ ~+	666	ggt	222												
			Gly		L	ga										1314
Deu .	Jer	435	Gly	пуз												
		433														
<210	. 1	6														
<210 <i>:</i>		37														
<211 <i>;</i>		RT														
<212 <i>&gt;</i>			sapi	anc												
~ 4 1 3 ~	п	Onio	∍eħ1(	C112												
<400>	. 1	<i>c</i>														
~ 4 UU2		Ų			•											

Met Ser Phe Pro Cys Lys Phe Val Ala Ser Phe Leu Leu Ile Phe Asn

	1			Ę	5				10	)				1	5
Va	l Se	r Se	r Lys		/ Ala	Va]	. Ser	Lys 25		ılle	e Thr	Ası	n Ala 30		u Glu
Th:	r Tr	p Gl;		a Leu	ı Gly	Gln	Asp 40		Asn	. Leu	ı Asp	) Ile 45		o Se:	r Phe
Glı	ъ Ме <sup>.</sup> 5		r Asp	Asp	) Ile	Asp 55		) Ile	Lys	Trp	60		Thi	s Sei	r Asp
Lys 65		s Lys	; Ile	Ala	Gln 70	Phe	Arg	Lys	Glu	Lys 75		Thr	Phe	e Lys	Glu 80
Lys	a Asp	Thr	Tyr	Lys 85		Phe	Lys	Asn	90	Thr	Leu	Lys	Ile	Lys 95	His
Leu	. Lys	Thr	100		Gln	Asp	Ile	Tyr 105	Lys	Val	Ser	Ile	Туг 110	_	Thr
Lys	Gly	Lys 115		Val	Leu	Glu	Lys 120	Ile	Phe	Asp	Leu	Lys 125	Ile	Gln	Glu
Arg	Val		Lys	Pro	Lys	Ile 135	Ser	Trp	Thr	Cys	Ile 140	Asn	Thr	Thr	Leu
Thr 145	Cys	Glu	Val	Met	Asn 150	Gly	Thr	Asp	Pro	Glu 155	Leu	Asn	Leu	Tyr	Gln 160
Asp	Gly	Lys	His	Leu 165	Lys	Leu	Ser	Gln	Arg 170	Val	Ile	Thr	His	Lys 175	Trp
Thr	Thr	Ser	Leu 180	Ser	Ala	Lys		Lys 185	Cys	Thr	Ala	Gly	Asn 190	Lys	Val
Ser	Lys	Glu 195	Ser	Ser	Val (		Pro 200	Val .	Ser	Cys		Ala 205	Glu	Pro	Lys
Ser	Cys 210	Asp	Lys	Thr	His :	Thr 215	Cys	Pro 1	Pro (		Pro . 220	Ala	Pro	Glu	Leu

Le:		y G	ly	Pro	Se	r Va 23		ne :	Let	ı Ph	e Pr	o Pi 23		rs Pi	co 1	Lys	As	p Thr 240	
Lei	Me	t I	le	Ser	24		ır Pı	co (	Glu	ı Va	1 Th 25		's Va	l Vā	ıl V	/al	As <sub>1</sub>	p Val 5	
Ser	Hi.	s G		Asp 260		o Gl	u Va	ıl I	Ĺys	Phe 265		n Tr	р Ту	r Va		Asp 270	Gl	y Val	
Glu	ı Va	1 Hi		Asn	Al	a Ly	s Th		80		Ar	g Gl	u Gl	u G1 28		'yr	Asr	n Ser	
Thr	Ту: 290		:g 1	Val	Va:	l Se	r Va 29		eu	Thr	Va.	l Le	и Ні: 300		n A	sp	Trp	) Leu	
Asn 305		/ Ly	's (	Slu	Туг	310		s L	ys	Val	Sei	31:		s Al	a L	eu	Pro	Ala 320	
Pro	Ile	: G1	u I	ys	Thr 325		e Se:	r L	ys	Ala	Lys		/ Glr	n Pro	о A:	rg	Glu 335	Pro	
Gln	Val	Ту		hr 40	Leu	Pro	Pro	o S	er	Arg 345	Asp	Glu	ı Leu	Thi	: Ly		Asn	Gln	
Val	Ser	Le:		hr	Cys	Leu	· Val		ys 60	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser 365		ър	Ile	Ala	
/al	Glu 370	Trp	o G	lu	Ser	Asn	G1y 375		ln	Pro	Glu	Asn	Asn 380	Tyr	Ly	s :	Phr	Thr	
ro 885	Pro	Val	. Le	eu .	Asp	Ser 390		Gl	·У	Ser	Phe	Phe 395	Leu	Tyr	Se	r I	bys	Leu 4.00	
'hr	Val	Asp	· Ly		Ser 405	Arg	Trp	Gl	n (		Gly 410	Asn	Val	Phe	Sė		ys 15	Ser	
al 1	Met	His	G1 42		Ala	Leu	His	As		His 125	Tyr	Thr	Gln	Lys	Sei 430		eu	Ser	

Ŀ€	eu Se	er Pi	ro G.	Ly Ly	'S											
		4:	35													
<2	10>	1	.7						•							
<2	11>	1	854													
<2	12>	E	NA													
<2	13>	Н	omo	sapi	ens											
				•												
<2	20>															
<2	21>	С	DS													
<2	22>	(	1)	(185	1)											
<2	23>	С	D2-C	D2/F	С											
< 4 (	>00	1	7													
ato	gage	c tt	t cc	a tgt	aaa	a tti	gta	gc	ago	tto	ctt	ct	g att	t tto	c aat	48
Met	: Se	r Phe	e Pro	o Cys	Lys	Phe	e Val	Ala	a Ser	Phe	e Let	ມ Leາ	ı Ile	Phe	Asn	-
1	l			5	5				10	)				15	5	
gtt	tct	tco	aaa	a ggt	gca	gto	tcc	aaa	gag	att	acg	, aat	gcc	ttg	gaa	96
Val	Ser	Sei	Lys	s Gly	Ala	Val	Ser	Lys	Glu	Ile	Thr	Asr	n Ala	Let	Glu	
			20	)				25	1				30	)		
				ttg												144
Thr	Trp	Gly	Ala	Leu	Gly	Gln	Asp	Ile	Asn	Leu	Asp	Ile	Pro	Ser	Phe	
		35					40					45	•			
				gat											-	192
Gln		Ser	Asp	Asp	Ile	Asp	Asp	Ile	Lys	Trp	Glu	Lys	Thr	Ser	Asp	
	50					55					60					
				gca											-	240
	Lys	Lys	Ile	Ala		Phe	Arg	Lys	Glu	Lys	Glu	Thr	Phe	Lys	Glu	
65					70					75					. 80	
				aag												288
ys	Asp	Thr	Tyr	Lys	Leu	Phe	Lys	Asn	Gly	Thr	Leu	Lys	Ile	Lys	His	
				85					90					95		

ct	g aa	g	acc	gat	gat	t cag	g gat	ato	tac	c aa	g gt	a tc	a at	a ta	t ga	t aca	336
Le	u Ly	s '	Thr	Asp	Asp	o Gli	n Asp	Ile	туг	Ly:	s Va	l Se	r Il	е Ту	r As	p Thr	
				100	)				105	5				11	0		
aa	a gg	a a	aaa	aat	gto	tto	ı gaa	a aaa	ata	ı tti	t da	t tto	aa c	o at	t ca	a gag	384
																n Glu	364
-			115					120				p bec	12!		C G1.	ı Giu	
								120					12.	,			
200	a at	c t		555	CCE		, ato	too	t a a							c ctg	
																c ctg	432
. A.L.			)er	гуз	FIC	, гу			rrp	Thi	. Cy			ı Tn	r Thi	. Leu	
	13	U					135					140	)				
																caa	480
		s G	ilu	Val	Met	Asn	Gly	Thr	Asp	Pro	Glı	ı Lev	Asr	Lei	туг	Gln	
145	5					150					155	5				160	
gat	gg	j a	aa	cat	cta	aaa	ċtt	tct	cag	agg	gto	atc	aca	cac	aag	tgg	528
Asp	Gly	, L	ys	His	Leu	Lys	Leu	Ser	Gln	Arg	Val	Ile	Thr	His	Lys	Trp	
					165					170					175		
acc	acc	a	gc	ctg	agt	gca	aaa	ttc	aag	tgc	aca	gca	ggg	aac	aaa	gtc	576
Thr	Thi	s	er	Leu	Ser	Ala	Lys	Phe	Lys	Cys	Thr	Ala	Gly	Asn	Lys	Val	
				180					185				_	190	_		
agc	aag	g	aa	tcc	agt	gtc	gag	cct	gtc	agc	tat	cct	aaa	gag	att	aco	624
												Pro				-	02.
	_		95					200			- 2 -		205			****	
													200				
aat	acc	tt	ta (	σaa	acc	taa	aat	acc	ttσ	aat	cad	gac	atc	220	++~	~ ~ ~	67.0
												Asp			_	-	672
	210	~`			****	110	215	7114	шец	GIY	GIII		116	ASII	Leu	Asp	
							213					220					
2++	0.01									_ 4- 4							
												gat				-	720
	PIO	56	er i	rne (			ser.	Asp A	Asp			Asp	Ile	Lys	Trp	Glu	
225						230					235					240	
												aga					768
Lys	Thr	Se	r A	sp 1	Lys :	Lys	Lys :	Ile A	Ala (	Gln .	Phe	Arg	Lys	Glu	Lys	Glu	
				2	245				2	250					255		

															t ct		816
Th	r Ph	e Ly	s Gl 26		s As	p Th	r Ty			u Ph	e Ly:	s As			ır Lev	ı	
			20	·				26	5				27	U			
aa	a at	t aa	g ca	t ct	g aa	g ac	gat	gat	t cag	g gat	t ato	c ta	c aa	g gt	a tca	3	864
Ly	s Il	e Ly	s Hi	s Le	Ly:	s Thi	. Asp	Ası	o Gli	a Ası	o Ile	е Ту	r Ly	s Va	1 Ser	c	
		27	5				280					28	5				
ata	a ta	t as	t ac	9 222			+	a to	· ++						t ttg		
															t ttg p Leu		912
	29			,.	. 013	295			. 100	. 010	300		e FII	e AS	р геп		
															t atc		960
Lys	s Ile	e Gli	n Glu	ı Arg	Val	Ser	Lys	Pro	Lys	Ile	Ser	Trp	Th:	Cy:	s Ile		
305	5				310	)				315	•				320		
220			c+ c		+ ~+	~~~	-4-										
															a tta u Leu		1008
			. 200	325		GIU	Vai	1160	330	вту	IIII	ASP	Pro	335			
														550	,		
aac	ctç	tat	caa	gat	ggg	aaa	cat	cta	aaa	ctt	tct	cag	agg	gtc	atc		1056
Asn	Lev	Tyr	Gln	Asp	Gly	Lys	His	Leu	Lys	Leu	Ser	Gln	Arg	Val	lle		
			340					345					350				
															gca		1104
1111	uis	355		1111	1111	ser	Leu 360	ser	Ата	ьуѕ	Pne	ьуs 365	Cys	Thr	Ala		
							500					303					
ggg	aac	aaa	gtc	agc	aag	gaa	tcc	agt	gtc	gag	cct	gtc	agc	tgt	cct		1152
Gly	Asn	Lys	Val	Ser	Lys	Glu	Ser	Ser	Val	Glu	Pro	Val	Ser	Cys	Pro		
	370					375					380						
							aaa										1200
	Glu	Pro	гуѕ			Asp	Lys	Thr			Cys	Pro	Pro	Cys			
385					390					395					400		
gca	cct	gaa	ctc	ctg	gga	gga	ccg 1	tca	atc	ttc	ctc	tto	ccc	cca	222		1248
.Ala																	1240
				405	-	-			410					415	-,-		

				r Le	c at				Th				al Ti		-	-	1296
			p Va.		c cae			Pro					e As				1344
		Gl			g gto ı Val		Asn					s Pr					1392
					tac Tyr	cgg Arg	gtg				cto Lei	c ac			s Hi	s	1440
cag					ggc	aag			Lys	tgc	: aag			r Ası	Ly:	a	1488
			Ala	ccc	atc Ile			Thr							ı caç		1536
		Glu			gtg Val									gag			1584
acc a																	1632
	530 jac	atc	gcc	gtg	gag	535 tgg (	gag a	agc a	aat q	<b>9</b> 99	540 cag	ccg	gag	aac	aac		1680
545 tac a	ag a	acc i	acg	cct	550 ccc (	gtg d	etg g	ac t	cc g	555 jac (	ggc	tcc	ttc	ttc	560 ctc		1728
Tyr L	ys T	rnr '		Pro :	Pro \	/al I	eu A		er A 70	lsp (	Gly .	Ser	Phe	Phe 575	Leu		

tac age aag etc ace gtg gae aag age agg tgg cag cag ggg aac gte 1776 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val 585 ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag 1824 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln 595 600 605 aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 1854 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 610 615 <210> 18 <211> 617 <212> PRT <213> Homo sapiens Met Ser Phe Pro Cys Lys Phe Val Ala Ser Phe Leu Leu Ile Phe Asn 5 10 Val Ser Ser Lys Gly Ala Val Ser Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Glu 20 25 Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp Ile Asn Leu Asp Ile Pro Ser Phe 35 40 Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp Ile Lys Trp Glu Lys Thr Ser Asp 50 Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg Lys Glu Lys Glu Thr Phe Lys Glu 65 75 Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys Asn Gly Thr Leu Lys Ile Lys His 90 85 Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile Tyr Lys Val Ser Ile Tyr Asp Thr 100 105

Lys	Gly	y Lys 115		n Val	l Leu	Glu	120		Phe	e Asp	) Let	125		e Gla	n Glu
Arg	130		Lys	s Pro	) Lys	135		Trp	Thi	r Cys	140		Th	r Thi	: Leu
Thr 145		s Glu	ı Val	. Met	150		Thr	Asp	Pro	155		a Asr	ı Leı	туг	160
Asp	G13	, Lys	His	165		Leu	Ser	Gln	170		. Ile	Thr	His	175	Trp
Thr	Thr	: Ser	180		Ala	Lys	Phe	Lys 185		Thr	Ala	Gly	Asr 190		: Val
Ser	Lys	Glu 195		Ser	Val	Glu	Pro 200		Ser	Cys	Pro	Lys 205		ılle	Thr
Asn	Ala 210		Glu	Thr	Trp	Gly 215	Ala	Leu	Gly	Gln	Asp 220	Ile	Asn	Leu	Asp
Ile 225	Pro	Ser	Phe	Gln	Met 230	Ser	Asp	Asp	Ile	Asp 235	Asp	Ile	Lys	Trp	Glu 240
Lys	Thr	Ser	Asp	Lys 245	Lys	Lys	Ile	Ala	Gln 250	Phe	Arg	Lys	Glu	Lys 255	Glu
Thr	Phe	Lys	Glu 260	Lys	Asp	Thr	Tyr	Lys 265	Leu	Phe	Lys	Asn	Gly 270	Thr	Leu
Lys	Ile	Lys 275	His	Leu	Lys		Asp 280	_	Gln	Asp	lle	Tyr 285	Lys	Val	Ser
Ile	Tyr 290	Asp	Thr	Lys	Gly	Lys 295	Asn	Val	Leu	Glu	Lys 300	Ile	Phe	Asp	Leu
Lys 305	Ile	Gln	Glu	Arg	Val 310	Ser	Lys	Pro	Lys	11e 315	Ser	Trp	Thr	Cys	Ile 320
Asn	Thr	Thr	Leu	Thr	Cys	Glu	Val	Met	Asn	Gly	Thr	Asp	Pro	Glu	Leu

				32	5				330	o				33	5 -
As	n Le	и Ту	r Gl 34		p Gly	y Ly:	s Hi	s Lei 345		s Lei	ı Sei	Gl:	n Ar 35		l Ile
Th:	r Hi	s Ly 35		p Th	r Thi	s Se	7 Lei		Ala	Lys	s Phe	365		s Th:	r Ala
Gly	y As:		s Vā	l Se	c Lys	375		Ser	· Val	. Glu	380		. Se:	c Cys	s Pro
Ala 385		u Pr	o Ly:	s Sei	Cys		Lys	Thr	His	Thr 395		Pro	Pro	Cys	9 Pro 400
Ala	Pro	o Gl	u Let	a Leu 405		Gly	Pro	Ser	Val 410		Leu	Phe	Pro	Pro 415	Lys
Pro	Lys	s Ası	7 Thi		Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr 430		Val
Val	Val	. Asp 435		. Ser	His	Glu	Asp 440	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr
Val	Asp 450		v Val	Glu	Val	His 455	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys 460	Pro	Arg	Glu	Glu
Gln 465	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr 470	Arg	Val	Val	Ser	Val 475	Leu	Thr	Val	Cys	His 480
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn 485	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys 490	Cys	Lys	Val	Ser	Asn 495	Lys
Ala	Leu	Pro	Ala 500	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr 505	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys 510	Gly	Gln
Pro	Arg	Glu 515	Pro	Gln	Val		Thr 520	Leu	Pro	Pro		Arg 525		Glu	Leu
Thr	Lys 530	Asn	Gln	Val		Leu 535	Thr	Cys :	Leu '		Lys (	Gly	Phe	Tyr	Pro

Ser	Asp	o Ile	e Ala	a Va	l Glu	Trp	Glu	Sei	r As	n Gl	y Gl	n Pr	o Gl	ı As	n Asr	ì
545	•				550	)				55.	5				560	)
_				_	_		_	_								
Tyr	: гуз	Thi	r Th			val	Leu	Ası			9 G1	y Se	r Phe		e Leu	t
				56	•				57	U				57	5	
m				. m.		2	7	0			۵,					
Tyr	Sei	гуу			. vai	Asp	гàг			g Tr	o Gli	n Gl:			n Val	
			580	,				585	•				590	)		
Pho	Sar	Cve		- 17= 1	Mot	uic	C1	- ו ת			. 7	. 175	. m	- m	c Gln	
rne	361	595		. val	. Mec	nis	600		ı be	u ni:	ASI	60		Thi	c Gin	•
		330	•				000					60.	5			
Lvs	Ser	Len	Ser	· T.e.	Ser	Pro	Glv	T.vs								
-,-	610			. 500	. 501	615	Cry	2,5	•							
						010										
<21	0>	19														
<21	1>	11	34													
<21	2>	DN	A													
<21	3>	Но	mo s	apie	ns											
<22	>															
<22	1>	CD	s													
<222	2>	(1	) (	1131	)											
<223	3>	CT	LA4/	Fc												
<400		19														
					tgc											48
Met	Arg	Thr	Trp	Pro	Cys	Thr	Leu	Leu	Phe	Phe	Leu	Leu	Phe	Ile	Pro	
1				5					10					15		
					atg									_	_	96
/al	Phe	Cys		Ala	Met	His '	Val .		Gln	Pro	Ala	Val		Leu	Ala	
			20					25					30.			
							L L A-									
					gcc											144
er	ser	Arg 35	стА	тте	Ala	ser !	Phe '	val	cys	GLU	Tyr	Ala	ser	Pro	Gly	
							22 1 1					A ==				

aa	a gc	c ac	t ga	g gt	c cg	g gt	g ac	a gt	g ct	t cg	g ca	g gc	t ga	c ag	c cag	192
Ly	s Al	a Th	r Gl	u Va	l Ar	g Val	l Th	r Va	l Le	u Ar	g Gl	n Al	a As	p Se	r Gln	
	5	0				55	5				6	0				
															g acc	240
		r Gli	ע Val	l Cys			Th	г Туз	r Met			y As	n Gl	u Le	u Thr	
65	)				7(	)				7	5				80	
tto	· cta	a mat	- mat	· +c	276					. +					a gtg	
															a gtg n Val	288
				85		. Cys	. 1111	. 013	90		. 361	L GI	y AS	9:		
									,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,		٠			٠,	,	
aac	cto	act	ato	: caa	ı gga	ctg	agg	gcc	atg	gad	acq	g gga	a cto	c tac	atc	336
															r Ile	
			100	)				105	•				110	)		
															ggc	384
Cys	Lys			Leu	Met	Tyr	Pro	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Let	1 G13	, Ile	e Gly	
		115					120					125	5			
	~~-															
								gat						-		432
*****	130	1111	GIII	116	TYL	135	116	Asp	PIO	GIU	140	_	Pro	Asp	Ser	
						100					140					
gca	gag	ccc	aaa	tct	tgt	gac	aaa	act	cac	aca	tgc	cca	ccq	tqc	cca	480
								Thr								
145					150					155					160	
								tca								528
Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	
				165					170					175		
~~~	226	~~~														
								cgg						-		576
110	БуЗ	nsp	180	ьец	Met	116	ser	Arg 185	Int	PIO	GIU	vaı		Cys	Val	
			100					100					190			
gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gaq	qtc	aao	ttc	āac	taa	tac	624
								Pro								023
		195					200					205		<u> </u>	· <b>,</b> -	

	Gly				Asn					Pro			g gag ı Glu	672
Tyr		_		Arg		-	_	-	Leu		-	•	cac His 240	720
			Gly	aag Lys			-	_		_			Lys	768
				gag Glu									_	816
				tac Tyr									_	864
				ctg Leu 295			_	-						912
				tgg Trp					-	_				960
				gtg Val	_	_		_						1008
				gac Asp	Lys									1056
Ser				cat His					Asn			_	_	1104

	Ser	Lev			tct Ser	Pro	617				t	ga				11:	3
	370	)				375	)										
<21	0>	20															
<21	1>	377															
<21	2>	PRT															
<21	3>	Homo	sap	iens	i												
<40	0>	20															
Met	Arg	Thr	Trp	Pro	Cys	Thr	Leu	Leu	Phe	Phe	Let	Let	Phe	: Ile	Pro		
1				5					10	ı				15	<b>5</b>		
Val	Phe	Cys	Lys	Ala	Met	His	Val	Ala	Gln	Pro	Ala	Val	٧al	Leu	Ala		
			20					25					30	)			
Ser	Ser	Arg	Gly	Ile	Ala	Ser	Phe	Val	Cys	Glu	Tyr	Ala	Ser	Pro	Gly		
		35					40					45					
												-					
Lys		Thr	Glu	Val	Arg	Val	Thr	Val	Leu	Arg	Gln	Ala	Asp	Ser	Gln		
	50					55					60						
	Thr	Glu	Val	Cys		Ala	Thr	Tyr	Met		Gly	Asn	Glu	Leu	Thr		
65					70					75					80		
Db.	<b>.</b>			_		_					_						
Pne	ьеи	Asp	Asp		11e	Cys	Thr	GIĀ		Ser	Ser	Gly	Asn		Val		
				85					90					95			
Zen	T.611	ሞb ∽	Tle	Gla	Cl v	T 011	71	חות	Mot	۸	mh	Gly	7	m	71.		
ASH	БСС	III	100	GIII	СТУ	neu	AIG		Mec	ASP	1111	GIA		Tyr	iie		
			100					105					110				
Cys	Lvs	۷al	Glu	Len	Met	Tyr	Pro	Pro	Pro	Tvr	Tur	Len	Gly	Tlo	C3.v		
- 4 -		115				- , -	120		0	- 3 ~	- y -	125	O.L.Y	116	ЭТУ		
												120					
Asn	Gly	Thr	Gln	Ile	Tvr	Val	Ile	Asp	Pro	Glu	Pro	Cvs	Pro	Asp	Ser		
	130					135					140	٠,٠					

Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

145	5				150	)				155	5				160
Ala	a Pr	o Gl	u Le	u Le		/ Gly	y Pro	se:	r Val		e Leu	Phe	Pro	) Pro	Lys
Pro	Ly:	s As	p Th:		ı Met	: Ile	e Ser	185		Pro	Glu	Val	Thr 190		s Val
Va]	. Vai	l As <sub>l</sub>		l Sei	r His	Glu	200		Glu	ı Val	Lys	Phe 205		Trp	Tyr
Val	Asp 210		y Val	l Glu	ı Val	His 215		Ala	Lys	Thr	Lys 220	Pro	Arg	Glu	Glu
Gln 225		Asr	n Ser	Thr	Tyr 230		Val	Val	Ser	Val 235	Leu	Thr	Val	Leu	His 240
Gln	Asp	Trp	Leu	245		Lys	Glu	Tyr	Lys 250	Cys	Lys	Val	Ser	Asn 255	Lys
Ala	Leu	Pro	260		Ile	Glu	Lys	Thr 265	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys 270	Gly	Gln
Pro	Arg	Glu 275		Gln	Val	Tyr	Thr 280	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg 285	Asp	Glu	Leu
Thr	Lys 290	Asn	Gln	Val	Ser	Leu 295	Thr	Cys	Leu	Val	Lys 300	Gly	Phe	Tyr	Pro
Ser 305	Asp	Ile	Ala	Val	Glu 310	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly 315	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn 320
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro 325	Pro	Val	Leu	Asp	Ser 330	Asp	Gly	Ser		Phe 335	Leu
Tyr	Ser	Lys	Leu 340	Thr	Val	Asp	Lys	Ser 345	Arg	Trp	Gln		Gly 350	Asn	Val
Phe	Ser	Cys 355	Ser	Val	Met :		Glu 360	Ala	Leu	His I		His :	Tyr '	Thr	Gln

	370	ס				37	5									
<21	10>	21	L													
<21	1>	15	509													
<21	2>	Dì	ΙA													
<21	.3>	н	omo s	sapie	ens											
<22	0>															
<22	1>	CI	s													
<22	2>	(1	.) (	(1506	5)											
<22	3>	CI	LA4-	-CTLA	4/Fc	:										
<40	0>	21														
atg	agg	acc	tgg	ccc	tgc	act	ctc	ctg	ttt	ttt	ctt	ctc	ttc	ato	cct	41
		Thr	Trp	Pro	Cys	Thr	Leu	Leu	Phe	Phe	Leu	Leu	Phe	Ile	Pro	ı
1				5					10	)				15		
												gtg				
Val	Phe	Cys			Met	His	Val		Gln	Pro	Ala	Val			Ala	
			20					25					30			
200	200	C 4 3	aac	a+ c	~~~	200	***	a+ a	+ ~+	~~~	***					• • •
												gca Ala				
501	501	35	Cly	110	nie	261	40	Val	Cys	Giu	ıyı	45	ser	PIO	GIĀ	
							-10					7.5				
aaa	gcc	act	gag	gtc	caa	ata	aca	ata	ctt	caa	cao	gct	gac	agc	cag	192
												Ala				132
-	50					55			•	5	60					
gtg	act	gaa	gtc	tgt	gcg	gca	acc	tac	atg	atg	ggg	aat	gag	ttg	acc	240
												Asn				
65					70					75					80	
ttc	cta	gat	gat	tcc	atc	tgc	acg	ggc	acc	tcc	agt	gga	aat	caa	gtg	288
Phe	Leu	Asp	Asp	Ser	Ile	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Gly	Asn	Gln	Val	
				85					90					95		

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

															c atc	336
			100	D				105	<b>,</b>				11	0		
tge	c aa	g gt	g gaq	g cto	e atç	g tac	cca	ccg	cca	tac	tac	c ct	g gg	c at	a ggc	384
Су	s Ly:	s Va 11		ı Leı	ı Met	Tyr	Pro 120		Pro	Туг	туз			y Il	e Gly	
		**	J				120					125	>			
															tcg	432
Asr			r Glr	ılle	Tyr	Val	Ile	Asp	Pro	Glu	Pro	Cys	s Pro	Ası	Ser	
	130	)				135					140	)				
															c cga	480
		Me	t His	Val			Pro	Ala	Val	Val	Leu	Ala	Sei	Ser	Arg	
145	•				150					155					160	
ggc	atc	gco	c ago	ttt	gtg	tgt	gag	tat	gca	tct	cca	ggc	aaa	gcc	act	528
Gly	Ile	Ala	a Ser	Phe	Val	Cys	Glu	Tyr	Ala	Ser	Pro	Gly	Lys	Ala	Thr	
	•			165					170					175		
gag	gtc	 cgc	ggtg	aca	gtg	ctt	cgg	cag	gct	gac	agc	cag	gtg	act	gaa	576
Glu	Val	Arg	, Val	Thr	Val	Leu	Arg	Gln	Ala	Asp	Ser	Gln	Val	Thr	Glu	
			180					185					190			
gtc	tgt	gcg	gca	acc	tac	atg	atg	ggg	aat	gag	ttg	acc	ttc	cta	gat	624
Val	Cys	Ala	Ala	Thr	Tyr	Met	Met	Gly	Asn	Glu	Leu	Thr	Phe	Leu	Asp	
		195					200					205				
gat	tcc	atc	tgc	acg	ggc	acc	tcc	agt	gga	aat	caa	gtg	aac	ctc	act	672
Asp	Ser	Ile	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Gly	Asn	Gln	Val	Asn	Leu	Thr	
	210					215					220					
atc	caa	gga	ctg	agg	gcc	atg	gac	acg	gga	ctc	tac	atc	tgc	aag	gtg	720
Ile	Gln	Gly	Leu	Arg	Ala	Met .	Asp '	Thr (	Gly	Leu	Tyr	Ile	Cys	Lys	Val	
225					230					235					240	
gag	ctc	atg	tac	cca	ccg	cca 1	tac 1	cac (	ctg (	ggc	ata	ggc	aac	gga	acc	768
			Tyr													*
				245				2	250					255		

ca	g at	t tai	t gta	att	gat	cca	gaa	ccg	tgo	cca	a gat	to	t gc	a ga	g ccc		816
Gl	n Ile	e Ty	r Val	Ile	Asp	Pro	Glu	Pro	Cys	Pro	Ası	Se:	r Al	a Gl	u Pro		
			260	)				265	•				27	0			
aaa	a tct	tgt:	gac	aaa	act	cac	aca	tgc	сса	cc	g tgo	cca	g gc	a cct	gaa		864
Lys	s Sei	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	a Pro	o Glu		
		275	5				280	٠.				285	5				
cto	ctç	ggg	g gga	ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	cce	aag	gac		912
Let	Let	617	, Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	asp		
	290	)				295					300	)					
acc	cto	atg	atc	tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gto	g gto	gac		960
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	. Val	. Val	Asp		
305	•				310					315					320		
gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gto	gac	ggc		1008
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly		
				325					330					335			•
					gcc												1056
Val	Glu	Val		Asn	Ala	Lys	Thr		Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn		
			340					345					350				
					gtc									-		•	1104
Ser	Thr		Arg	Val	Val	Ser		Leu	Thr	Val	Cys	His	Gln	Asp	Trp		
		355					360					365					
					tac												1152
Leu		GIA	Lys	GIU	Tyr		Cys	Lys	Val	Ser		Lys	Ala	Leu	Pro		
	370					375					380						
					acc												1200
	Pro	116	Glu	гуs	Thr	11e	Ser	Lys .			Gly	Gln	Pro	Arg			
385					390					395					400		
~ ~ ~			<b>.</b>														
					ctg												1248
r.o	GID	val			Lėu	Pro .	rro .			Asp	Glu	Leu	Thr		Asn		
				405				•	410					415			

cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc	1296
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile	
420 425 430	
gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc	
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr	1344
435 440 445	
acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag	1392
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys	
450 455 460	
ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc	1440
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys 465 470 475 480	
465 470 475 480	
tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc	1488
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu	1400
485 490 495	
·	
tee etg tet eeg ggt aaa tga	1509
Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
500	
<210> 22	
<211> 502	
<212> PRT	
<213> Homo sapiens	
<400> 22	
Met Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro	
1 5 10 15	
Val Phe Cyc Tyc Ala Mot Hie Val Ala Cla Dec Ala Val Val	
Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Leu Ala 20 25 30	
Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly	
35 40 45	

Ly		la 50	Th	r Gl	.u Va	l Ar		1 Th 5	ır Va	ıl Le	eu Ar		n Al O	a As	p Se	r Gln
Va 6		ır	Glu	υ Va	1 Су	s Al		a Th	r Ty	r Me		t G1 5	y As	n Gl	u Lei	Thr 80
Ph	e Le	ีน .	Asp	As	p Se 8		е Су	s Th	r Gl		nr Se 00	r Se	r Gl	y Ası	n Glr 95	val
Ası	n Le	บ '	Thr	10		n Gly	/ Let	ı Ar	g Al 10		t As	p Th:	r Gl	y Lei 110		lle
Cys			Val		u Lei	ע Met	: Туз	Pro 120		o Pr	о Ту:	т Туі	Le:		/ Ile	Gly
Asn	13		Flir	Glr	n Ile	e Tyr	Val		e Ası	o Pr	o Glu	1 Pro		s Pro	Asp	Ser
Asp 145		n M	iet	His	val	. Ala 150		Pro	Ala	a Vai	l Val		Ala	. Ser	Ser	Arg 160
Gly	Ile	: A	la	Ser	Phe 165		Cys	Glu	Туг	170	a Ser	Pro	Gly	Lys	Ala 175	Thr
Glu	Val	. А	rg	Val 180		Val	Leu	Arg	Gln 185		Asp	Ser	Gln	Val 190	Thr	Glu
Val	Cys		la 95	Ala	Thr	Tyr	Met	Met 200	Gly	Asn	Glu	Leu	Thr 205	Phe	Leu	Asp
Asp	Ser 210	13	le	Cys	Thr	Gly	Thr 215	Ser	Ser	Gly	Asn	Gln 220	Val	Asn	Leu	Thr
Ile 225	Gln	Gì	L <b>y</b> ∷	Leu	Arg	Ala 230	Met	Asp	Thr	Gly	Leu 235	Tyr	Ile	Cys		Val 240
Glu	Leu	Ме	t :	Tyr	Pro 245	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Leu 250	Gly	Ile	Gly		Gly 3	Thr

	G1r	11	е Т		a1 60		e As <sub>l</sub>	p Pr	o Gl	u Pr 26		s Pr	o As	p Se	r Al 27		u Pro
	Lys	Se:	r Cy 2		.sp	Ly:	s Th:	r Hi	s Th 28		s Pr	o Pr	o Cy:	s Pr		a Pr	o Gli
	Leu	Le:		ly G	ly	Pro	Sei	29		e Le	u Ph	e Pro	9 Pro		s Pr	o Ly	s Asp
	Thr 305		M∈	t I	le	Ser	310		r Pr	o Gl	u Va	1 Th:		s Val	l Vai	l Va	1 Asp 320
	Val	Sei	Hi:	s G	lu	Asp 325		Gl:	u Vai	l Ly:	33		Trp	туг	· Val	335	o Gly
	Val	Glu	ı Va		is 10	Asn	Ala	Ly	s Thi	345		o Arg	Glu	Glu	350		: Asn
:	Ser	Thr	Ту 35		g	Val	Val	Sei	7 Val		Th:	: Val	Cys	His 365		Asp	Trp
3	Leu	Asn 370		λΓ?	'S	Glu	Tyr	Lys 375		Lys	Val	. Ser	Asn 380	Lys	Ala	Leu	Pro
	Ala 885	Pro	Ile	e G1	u	Lys	Thr 390	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys 395	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu 400
F	ro	Gln	Va]	. Ту		Thr 405	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg 410	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys 415	Asn
3	ln	Val	Ser	Le:		Thr	Cys	Leu	Val	Lys 425	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser 430	Asp	Ile
ł	la '	Val	Glu 435		<b>,</b> (	Glu	Ser	Asn	Gly 440	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn 445	Tyr	Lys	Thr
		Pro	Pro	Val	LI	Leu		Ser 455	Asp	Gly	Ser		Phe 460	Leu	Tyr	Ser	Lys
	211 7	hr	Val	<i>\</i> ~ ~	. т		C	7	m	C1	C 1 -	0.1			_,	_	

465	470		475	480
Ser Val 1	Met His Glu Ala 485	Leu His Asn Hi	s Tyr Thr Gln Lys Se	
Ser Leu S	Ser Pro Gly Lys 500			
<210> <211>	23 1335			
<212> <213>	DNA Homo sapiens			
<220>				
	CDS			
<222>	(1)(1332)		•	
<223>	TNFR1/Fc			
<400>	23			
atg ggc c	tc tcc acc gtg	cct gac ctg ctg	ctg ccg ctg gtg cto	ctg 48
Met Gly L	eu Ser Thr Val	Pro Asp Leu Leu	Leu Pro Leu Val Leu	ı Leu
1	5	10	15	;
gag ctg t	g gtg gga ata	tac ccc tca ggg	gtt att gga ctg gto	cct 96
Glu Leu Le	eu Val Gly Ile '	Tyr Pro Ser Gly	Val Ile Gly Leu Val	Pro •
	20	25	30	
cac cta go	gg gac agg gag a	aag aga gat agt	gtg tgt ccc caa gga	aaa 144
His Leu Gl	y Asp Arg Glu I	Lys Arg Asp Ser	Val Cys Pro Gln Gly	Lys
3	5	40	45	
tat atc ca	c cct caa aat a	aat tog att tgc	tgt acc aag tgc cac	aaa 192
			Cys Thr Lys Cys His	
50		55	60	
gga acc ta	c ttg tac aat g	ac tgt cca ggc	ccg ggg cag gat acg	gac 240
			Pro Gly Gln Asp Thr	-
65	70		75	80

																		ctc		288
-		-		•	85			,			90		50.	. GI	u As	, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	95	Ded		
																		gtg		336
Alg	111	<i>3</i>		100	Ser	. Су:	s se	r ry	s c <sub></sub>		rg 1	,ys	GIL	ı Me	t G1 11		ln	Val		
							a gt													384
Glu	Il	9 Se		er	Cys	Thi	. Va	1 As <sub>1</sub>		g As	sp T	hr	Val	. Cy:		у С	γs	Arg		
							: tat													432
Lys	130		n T	yr	Arg	His	135		Se	r Gl	u A	sn	Leu 140		e Gl:	u C)	7S	Phe		
							aat													480
Asn 145	Cys	Se	r L	eu	Cys	Leu 150	Asn	Gly	Th:	r Va		is 55	Leu	Ser	Cys	s G1				
						100					1,	,,						160		
							acc													528
Lys	Gln	Ası	n Tì		Val 165	Cys	Thr	Cys	His	170		- <b>y</b>	Phe	Phe	Leu	17		Glu		
aac	gag	tgt	gt	.c t	tcc	tgt	agt	aac	tgt	aag	g aa	aa	agc	ctg	gag	tg	c a	acg		· 576
Asn	Glu	Cys			Ser	Cys	Ser	Asn			. Ly	s S	Ser	Leu	Glu	Су	s :	Thr		
			18						185	•					190					
aag	ttg	tgc	ct	a c	cc	cag	att	gag	aat	gtt	aa	g g	gc	act	gag	gad	: t	ca		624
Lys :	Leu			u P	ro e	Gln	Ile	Glu	Asn	Val	Ly	s G	Sly	Thr	Glu	Asp	) S	er		
		195						200						205						
ggc a	acc	aca	gc	a g	ag d	ccc	aaa	tct	tgt	gac	aaa	аа	ct	cac	aca	tac	c	ca		672
Gly																				0,2
2	210						215					2	20							
ccg t	gc	cca	gca	3 C	ct g	jaa :	ctc	ctg	ggq	gga	ccc	ı tı	ca d	itc	ttc	atic	+	t.c		720
Pro C																				. 20
225					2	30					235	1					24	4 O		

CC	cca	a aa	a cc	c aaç	g gad	ace	ct	c at	g at	c tc	c cg	g ac	c cc	t ga	g gto	:	768
Pro	o Pro	o Ly	s Pro	o Lys	s Asp	Th:	r Le	u Me	t Il	e Se	r Ar	g Th	r Pr	o Gl	u Val		
				245	5				25	0				25	5		
aca	a tgo	gt.	g gt	ggto	gad	gto	gago	c ca	c gaa	a ga	c cct	t ga	g gt	c aa	g ttc		816
Thi	Cys	s Va	l Val	l Val	. Asp	Val	Se	Hi:	s Gl	ı Ası	p Pro	o Gli	ı Va	l ľy	s Phe		
			260	)				26	5				27	0			
															g ccg		864
Asn	Trp			Asp	Gly	v Val			l His	Ası	n Ala	Lys	5 Th:	r Ly	s Pro		
		275	5				280	)				285	5				
		. ~=.			220	200											
															c acc ı Thr	٠	912
mrg	290		. G11	, TAT	VOII	295		1 71	. Arg	val			· val	l Lei	מתד נ		
	290					293					300	,					
gtc	ctg	cac	: caq	gac	taa	cta	aat	aac	aao	gad	tac	: aad	tac	. aac	g gtc		960
															y y z z		500
305				-	310					315		3	0,72	, .	320		
tcc	aac	aaa	gcc	ctc	cca	gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc		1008
Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala		
				325					330					335			•
				cga													1056
Lys	Gly	Gln		Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg		
			340					345					350				
~ a +	~~~	0+~	200						_ 4								
				aag													1104
тэр	GIU	355	1111	Lys	ASII	GIII		ser	ьеп	Thr	Cys		vaı	Lys	Gly		
		333					360					365					
ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	acc	ata	gag	taa	aaa	agc	aat	aaa	cac	cca		1152
				Asp													1132
	370					375		010		o Lu	380		Gry	GIN	FLO		
						-					200						
gag	aac	aac	tac	aag	acc	acg	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc		1200
				Lys													
385					390					395	-		-	•	400		

															ag ca in Gl		:	1248
				40	5				41	0				41	.5			
															c ca		1	296
GI	y As	n va	11 PN 42		r Cy	s Se	r Va	1 Me 42		s Gl	u Al	a Le	u Hi 43		n Hi	s		
									•				7.5					
				g ag										t	ga		1	335
Ty	r Th			s Se	r Le	ı Sei			r Pr	o Gl	y Ly	s						
		43	5				440	0										
<21		24																
<21		444																
<21 <21		PRT	o sai	piens	3													
			•															
<40		24																•
		Lei	ı Sei			Pro	Asp	Lev			Pro	) Let	ı Val		ı Leu	l		
1				5	•				. 10	)				15	5			
Glu	Leu	Lei	ı Val	Gly	Ile	Tyr	Pro	Ser	Gly	v Val	Ile	e Gly	, Let	ı Val	. Prő			
			20	)				25	5				30	)				
Hic	T. 6.13	G1.	, ,,,,,,	. 7.~~	C1.,	7	7	7		**- 7	_	_						
птэ	neu	35		Arg	GIU	ьуs	Arg 40	Asp	Ser	Val	Cys	Pro 45		Gly	Lys			
												,,,						
Tyr		His	Pro	Gln	Asn	Asn	Ser	Ile	Cys	Cys	Thr	Lys	Cys	His	Lys			
	50					55					60							
Gly	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Asn	Asp	Cvs	Pro	Glv	Pro	Glv	Gln	Aso	Thr	Asn			
65		-		•	70	•	- 2 -		,	75	011	01	p	1111	80			
						•												
Cys	Arg	Glu	Cys	Glu	Ser	Gly	Ser	Phe		Ala	Ser	Glu	Asn	His	Leu			
				85					90					95				
Arg	His	Суѕ	Leu	Ser	Cys	Ser	Lys	Cys	Arg	Lys	Glu	Met	Gly	Gln	Val			
			100					105					110					

Gl	u Il			er Cy	s Th	r Va			g As	p Th	r Va			у Су	s Arg
		11	. 5				12	0				12	5		
Ly	s As		π Ty	r Ar	g Hi	s Ty 13		p Se	r Gl	u As	n Le		e Gl:	n Cy	s Phe
Asi 145		s Se	r Le	u Cy	s Le		n Gl	y Th	r Va	1 Hi 15		u Sei	r Cy:	s Gl	n Glu 160
Lys	6 <b>G</b> 1:	n As	n Th	r Va 16		s Th:	r Cy	s Hi	s Al 17		y Phe	e Phe	: Le	17:	g Glu 5
Asn	Glı	и Су.	s Va 18		r Cy:	s Se	c Ası	n Cys 185		s Ly:	s Ser	Leu	1 Glu		3 Thr
Lys	Lev	1 Cy:		u Pro	o Glr	ı Ile	e Glu 200		va:	l Lys	s Gly	7 Thr 205		Asp	Ser
Gly	Thr 210		Ala	a Glı	ı Pro	215		Cys	a Asp	. Lys	220		Thr	Cys	Pro
Pro 225	Cys	Pro	Ala	a Pro	230		Leu	Gly	Gly	Pro 235		Val	Phe	Leu	Phe 240
Pro	Pro	Lys	Pro	245		Thr	Leu	Met	Ile 250		Arg	Thr	Pro	Glu 255	Val
Thr	Cys	Val	Val 260		Asp	Val	Ser	His 265	Glu	Asp	Pro	Glu	Val 270	Lys	Phe
Asn	Trp	Tyr 275	Val	Asp	Gly	Val	Glu 280	Val	His	Asn	Ala	Lys 285	Thr	Lys	Pro
rg	Glu 290	G1u	Gln	Tyr	Asn	Ser 295	Thr	Tyr	Arg	Val	Val 300	Ser	Val	Leu	Thr
al 05	Leu	His	Gln	Asp	Trp 310	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu 315	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val 320

			340	)				345	5				350	)			
Asp	Gli	1 T.e	n Thr	. T.VS	. Asn	G) n	. Val	S	· To:		Cua	7	**- *	_	s Gly		
	021	35		Lyo	71311	OII,	360		ьец	1111	Cys	365		. ьу.	s GIA		
Phe			Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gli	n Pro		
	370	)				375					380						
Glu	Asn	Ası	ı Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asn	G1 v	, Ser		
385			_	-	390					395				013	400		
														•			
Ser	Phe	Let	Tyr		Lys	Leu	Thr	Val		Lys	Ser	Arg	Trp	Glr	Gln		
				405					410					415	•		
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His		
			420					425					430		0		
Tyr	Thr		Lys	Ser	Leu	Ser		Ser	Pro	Gly	Lys						
		435					440										
<210	>	25															
<211		20	28														
<212		DN.															
<213	,	ног	no sa	pien	s												
<220	>																
<221	>	CDS	3	-													
<222		(1)	(2	025)													
<223	>	TNE	R2-T	NFR1,	/Fc												
<400>	•	25															
atg g	ica (	ccc	gtc q	gcc ç	gtc t	gg g	gcc g	icā d	tg g	icc ă	ıtc g	ga c	tg g	gag	ctc		48
Met A	ala 1	Pro	Val A		/al T	rp F	Ala A	la I	∍eu ⊅	la V	al G	ly I	eu G	ilu	Leu		
1				5					10					15			

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg

330

325

tgg	gc	t go	g gc	g ca	c gcd	ttç	g ccc	gcc	ca	g gt	g gc	a tt	t a	ca c	cc tac	:	96
Trp	Al	a Al	a Al	a Hi	s Ala	Leu	Pro	Ala	Gl	n Va	l Al	a Pi	ne Ti	nr P	ro Tyr		
			2	0				25	ı				:	30			
															ac cag		144
Ala	PIC	3		0 G17	y Ser	Thr			Leu	a Ar	g Gl			r As	sp Gln		
		3	5				40					4	5				
aca	act	ca	o ato	a tac	tac	agc	222	tac	+					+	a aaa		
															a aaa a Lys		192
	50			•	•	55	-3-	-1-			60			o Al	а цуб		
gtc	ttc	tgi	aco	aag	acc	tcg	gac	acc	gtg	tgt	gad	to	c tg	t ga	g gac		240
Val	Phe	Суз	Thi	Lys	Thr	Ser	Asp	Thr	Val	Cys	Asp	Se	r Cy	s Gl	u Asp		
65					70					75					80		
															c tgt		288
Ser	Thr	Туг	Thr		Leu	Trp	Asn	Trp		Pro	Glu	Cys	Lei	ı Se	r Cys		
				85					90					9:	5		
ggc	tcc	cgc	tgt	agc	tct	gac	cao	ata	σаа	act	caa	acc	. ta		cgg	,	226
															Arg		336
			100			_		105				,-	110				
gaa	cag	aac	cgc	atc	tgc	acc	tgc	agg	ccc	ggc	tgg	tac	tgo	gcg	ctg		384
Glu	Gln	Asn	Arg	Iļe	Суѕ	Thr	Cys .	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Cys	Ala	Leu		
		115					120					125					
agc a																	432
Ser I	.30	G111	GIU	GIY		Arg . 135	Leu (	Jys A	41a	Pro		Arg	Lys	Cys	Arg		
_						133					140						
ccg g	gc	ttc	ggc	gtg	gcc a	aga (	ca d	iga a	ct (	σaa	aca	tca	gac	ata	ata		480
Pro G																	400
145					150					155			•	Í	160		
tgc a																	528
Cys L	ys I	Pro	Cys .	Ala E	Pro G	ly T	hr P	he S	er A	sn :	Phr	Thr	Ser	Ser	Thr	•	
				165				1	70					175			

gat	att	t tg	c ago	g cco	cad	c caq	g ato	tg1	t aad	gte	ggt	g gc	c at	c cc	t ggg	İ	576
Asp	o Ile	е Су	s Ar	g Pro	His	s Glr	ılı	е Су:	s Ası	n Val	l Vai	l Ala	a Il	e Pr	o Gly	,	
			180	)				18	5				19	0			
aat	gca	a ago	ato	g gat	gca	gto	t go	acq	tco	acq	g tco		cac	c cg	g agt		624
Asr	Ala	s Se	Met	Asp	Ala	a Val	. Cys	Thi	Sei	Thi	Se:	r Pro	Th.	r Ar	g Ser		
		195	5				200	)				205	5				
															a tcc		672
Met	Ala	Pro	Gly	/ Ala	Val	His	Lev	Pro	Gln	Pro	Val	Ser	Th	r Ar	g Ser		
	210	)				215					220	)					
															tcc		720
		Thr	Gln	Pro			Glu	Pro	Ser	Thr	Ala	Pro	Sei	Thi	s Ser		
225					230					235					240		
															tcc		768
Phe	Leu	Leu	Pro		Gly	Pro	Ser	Pro		Ala	Glu	Gly	Ser	. GJ?	/ Ser		
				245					250					255	5		
				- 4 -													
														_	gat		816
GIY	ASII	116	260	Leu	vai	Pro	HIS		GIY	Asp	Arg	GIu			Asp		
			200					265					270				
ant	ata	tat	ccc	C 2 2	~~ =	223	+ > +	2+0	a.a.	22+					att		0.54
															Ile		864
		275	110	02	CLY	<i></i> 5	280	110	1113	FLO	GIII	285	ASII	ser	11e		
							200					200					
tgc	tgt	acc	aag	tgc	cac	aaa	gga	acc	tac	tta	tac	aat	gac	tat	cca		912
				Cys													212
	290		_	-		295	-		-		300			-1-			
ggc	ccg	ggg	cag	gat	acg	gac	tgc	agg	gag	tgt	gag	agc	ggc	tcc	ttc		960
				Asp													
305					310					315			_		320		
acc	gct	tca	gaa	aac	cac	ctc	aga	cac	tgc	ctc	agc	tgc	tcc	aaa	tgc		1008
Thr	Ala	Ser	Glu	Asn.	His	Leu .	Arg	His	Cys	Leu	Ser	Cys	Ser	Lys	Cys		
				325					330					335			

															c cgg	1056
Arg	Lys	s Gl			/ Glr	ı Val	Gli			Sei	c Cy:	s Th		-	o Arg	
			340	,				345					350	)		
gac	acc	gte	g tgt	ggo	tgo	agg	aag	aac	: caç	, tac	c cg	g ca	t tat	: tg	g agt	1104
															o Ser	
		355	5				360	)				36	5			
															acc	1152
Glu	Asn	Lev	Phe	Gln	Cys	Phe	Asn	Cys	Ser	Leu	Суз	Lei	ı Asr	G17	y Thr	
	370					375					380	)				
a+ =				+												
													acc	_	cat His	1200
385		nec	361	Суз	390	Giu	ъys	GIII	ASII	395		. cys	rnr	Cys		
303					390					393					400	
gca	ggt	ttc	ttt	cta	aga	gaa	aac	gag	tgt	gtc	tcc	tat	agt	aac	tat	1248
													Ser			
				405					410			•		415	-	
aag	aaa	agc	ctg	gag	tgc	acg	aag	ttg	tgc	cta	ccc	cag	att	gag	aat	1296
Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Cys	Thr	Lys	Leu	Cys	Leu	Pro	Gln	Ile	Glu	Asn	
			420					425					430			
_ + +																
													aaa			1344
Vai	гуѕ	435	IHE	GIU	Asp	ser	440	Thr	Thr	АТА	GIU		Lys	Ser	Cys	
		733					440					445				
gac	aaa	act	cac	aca	tgc	cca	ccg	tgc	cca	qca	cct	αaa	ctc	cta	aaa	1392
													Leu			2002
	450					455					460				•	
gga	cçg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	сса	aaa	ccc	aag	gac	acc	ctc	atg	1440
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
465					470					475					480	
													gtg			1488
ile	ser	Arg			Glu '	Val '	Thr			Val	Val	Asp	Val		His	
				485					490					495		

							g tto s Phe											1536
				500					505					51				
							g ccg											1584
Hi.	s As		la I 15	ys	Thr	Lys	s Pro			ı Glı	ı Gl:	п Ту			r Th	ır '	Tyr	
		J.	IJ					520	,				52	5				
cg	ggt	g gt	c a	gc	gtc	cto	acc	gto	ctg	cac	caq	g ga	c tg	g ct	g aa	ıt (	ggc	1632
Arq	y Va	l Va	al S	er	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gli	n Ası	Tr	p Le	u As	n (	Gly	
	53	0					535	•				540	)					
							gtc											1680
		Ту	r L	ys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Lei	ı Pro	Al.	a Pr	0 ]	lle	
545	•					550					555	<b>,</b>				5	60	
qaq	aaa	аас	c a	tc	tcc	aaa	gcc	222	aaa	can	ccc					~ ~	. + ~	1700
							Ala											1728
					565	•		•		570			010		57		aı	
							cgg										-	1776
Tyr	Thr	. Le			Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Glr	Va:	l s	er	
			58	30					585					590	)			
ctg	acc	tgo	c ct	.a (	atc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	aac	nac.	ato	acc.	o to	. ~	~	3.004
							Gly								-	_	-	1824
		595				-		600	-				605					
tgg	gag	ago	: aa	t c	ggg	cag	ccg	gag	aac	aac	tac	aag	acc	acg	cct	c	cc	1872
Trp	Glu	Ser	As	n (	Sly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pi	0	
	610						615					620						
ata	cta	aac	tc	c	ac i	ממכ	tcc	t cc	++-	a+ a	+			_+_				
							Ser.											1920
625		<u>r</u> -		•		630			-115		1 y L 635	261	пуs	ren	ınr	va 64		
																04	J	
gac	aag	agc	ag	g t	gg d	cag	cag (	ggg a	aac q	gtc 1	ttc	tca	tgc	tcc	gtg	at	g	1968
Asp															_		_	-
				6	45				6	550					655			

cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct 2016 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser 660 665 670 ccg ggt aaa tga 2028 Pro Gly Lys 675 <210> 26 <211> 675 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 26 Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu 5 Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr 20 25 Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln 35 40 45 . Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys 50 55 Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp 65 70 Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys 85 .Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg 100 105 Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu 120 . 125 115

Se		ys G 30	iln	Gli	u G1	y C		rg 35	Leu	Су	s Al	a Pi		ອນ <i>I</i> 10	Arg	Ly	s Cy	/s Arc	ì
Pr 14		ly P	'ne,	Gly	y Va	1 A1		rg	Pro	Gl	y Th	r G1		nr S	Ser	As	p Vā	1 Val	
Су	s Ly	's P	ro	Cys	3 Al 16		o G	ly '	Thr	Phe	e Se 17		n Th	ır T	hr	Se	r Se 17	r Thr	
As	p Il	e C	ys	Arg		o Hi	s Gl	ln :	Ile	Cys		n Va	l Va	l A	la	116		o Gly	
As	n Al		er 95	Met	Ası	o Al	a Va		Cys 200	Thr	Se	r Th	r Se		ro 05	Thi	r Ar	g Ser	
Me	21		ro	Gly	Ala	a Vai	1 Ні . 21		eu	Pro	Glr	n Pro	o Va. 22		er	Thr	Ar	g Ser	
Gl: 225		5 T}	ır	Gln	Pro	230		o G	lu	Pro	Ser	Th:		a Pi	ro	Ser	ולת.	s Ser 240	
Phe	e Lei	ı Le	:น :	Pro	Met 245		Pr	o S	er	Pro	Pro 250		a Glu	1 G]	ly	Ser	Gly 255	/ Ser	
Gly	Asr	: I1		Ser 260	Leu	Val	Pro	о Н.		Leu 265	Gly	Asp	Arg	G]		Lys 270	Arg	Asp	
Ser	Val	Су 27		Pro	Gln	Gly	Lys		yr : 30	Ile	His	Pro	Gln	As		Asn	Ser	Ile	
Cys	Cys 290	Th.	r I	ys	Cys	His	Lys 295		ly T	Thr	Tyr	Leu	Туг 300	As	n A	Asp	Cys	Pro	
Gly 305	Pro	Gly	y G	ln .	Asp	Thr 310	Asp	Су	'S P	ırg	Glu	Cys 315	Glu	Se	r G	Sly	Ser	Phe 320	
Thr	Ala	Sei	: G		Asn 325	His	Leu	Ar	gН		Cys 330	Leu	Ser	Cys	s S		Lys 335	Cys	
Arg	Lys	Glu	ı M	et (	31 y	Gln	Val	Gl	u I	le s	Ser	Ser	Cys	Thr	· V	al i	Asp	Arg	

				34	0					34	5					3	50		
As	p T	hr	Va.		s Gl	ly C	/s A:		ys 60		n Gl	ln 7	ſyr	Ar	g Hi 36		γľ	Trp	Ser
G1		sn 70	Lei	u Ph	e Gl	n Cy	s Pl		sn	Cy.	s Se	er L	eu	Су: 38(		eu As	sn (	31 y	Thr
Va 38		is	Let	ı Se	r Cy	s Gl 39		lu L	ys	Glı	n As		hr 95	Vai	l Cy	s Th	ır (	Cys	His 400
Al	a G]	lу	Phe	e Ph	e Le 40		g Gl	u A	sn	Glı	2 Cy 41		al	Ser	с Су	s Se		lsn 15	Cys
Ly	s Ly	s	Ser	Let 420		u Cy	s Th	r L)	/S	Leu 425		s L	eu	Pro	Gl:	n Il 43		lu	Asn
Val	l Ly		Gly 435		Glı	a Ası	o Se	r Gl 44		Thr	Th:	r A.	la	Glu	Pro		s S	er	Cys
Asp	45		Thr	His	Thi	Cys	9 Pro		0	Cys	Pro	Al		Pro 460	Glı	ı Lei	ı L	eu	Gly
Gly 465		0 ;	Ser	Val	 Phe	470		∍ Pr	о :	Pro	Lys	9 Pr		Lys	Asp	Th:	: L	eu	Met 480
Ile	Sei	r 7	Arg	Thr	Pro 485	Glu	. Val	Th	r (	Cys	Val 490		1 '	Val	Asp	Val	. Se		His
Glu	Asp	E	?ro	Glu 500	Val	Lys	Phe	Ası		rp 805	Tyr	Va	1 7	Asp	Gly	Val 510		.u '	Val
His	Asn		15	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg 520		lu	Glu	Gli	T n		Asn 525	Ser	Th	r:	Гуr
Arg	Val 530		al	Ser	Val	Leu	Thr 535	Val	L	eu	His	Glr		.sp 40	Trp	Leu	As	n G	Sly
Lys 545	Glu	T	yr :	Lys	Cys	Lys 550	Val	Ser	A	sn :	Lys	Ala 555		eu :	Pro	Ala	Pr		1e 60

Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Va.
				565					570					575	
Tyr	Thr	Leu	Pro 580	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu 585		Thr	Lys	Asn	Gln 590	Val	Sei
Leu	Thr		Leu	Val	Lys	Gly		Туг	Pro	Ser	Asp		Ala	Val	Glu
		595					600					605			
Trp	Glu 610	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro 615	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys 620	Thr	Thr	Pro	Pro
<b>Val</b> 625	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly 630	Ser	Ser	Phe	Leu	Tyr 635	Ser	Lys	Leu	Thr	Val 640
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp 645	Gln	Gln	Gly	Asn	Val 650	Phe	Ser	Cys	Ser	Val 655	Met
His	Glu	Ala	Leu 660	His	Asn	His	Tyr	Thr 665	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser 670	Leu	Ser
<b></b>	<b>6</b> 1.	_													